

# **Methodische Untersuchungen zum Einsatz neudesignter Fluorochrome in der Immunhistochemie**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
**Christian Johannes Schürer**  
geboren am 01.04.1983 in Greiz

Gutachter:

1.

Prof. Dr. med. habil. Karl-Jürgen Halbhuber

Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Institut für Anatomie / Anatomie II

2.

PD Dr. Alexander Berndt

Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Institut für Pathologie

3.

Ph.D., D.Sc. Juergen Mollenhauer

Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut (NMI)

An der Universität Tübingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.06.2009

Es ist aber der Glaube ein Beharren auf dem, was man hofft,  
eine Überzeugung von Tatsachen, die man nicht sieht.

Hebr. 11,1

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
abs.	absolut
a.d.	aqua dest
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	AP-antiAP
Background / bgr	Hintergrundfluoreszenz
bathochromer shift	Verschiebung einer Emissionswellenlänge in Richtung langwelligeren Bereich
BT	Blue Tetrazolium = methoxy-Derivat von NT
CARD	catalyzed reporter deposition
CLSM	Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMFA	N,N-Dimethylformamide
EIA	Enzymimmunoassays
FG	Fischgelatine
FIA	Fluoreszenzimmunoassays
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanate
GAL	$\beta$ -D-Galactosidase
Half Nitro-BT	2-phenyl-3-[3-methoxy-4-phenyl]-5-[p-nitrophenyl]-tetrazolium chlorid
Half TNBT	2,5-di[p-nitrophenyl]-3-[3-methoxy-4-phenyl]tetrazolium chlorid
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IA	Immuno-Assays
Ig	Immunglobuline
INT	2-[p-iodophenyl]-3-[p-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chlorid

LAB	labeled Avidin-Biotin
$\lambda$	Wellenlänge (in nm)
$\lambda_{\text{Ex}}$	Anregungswellenlänge der Fluoreszenz
$\lambda_{\text{Em}}$	Emissionswellenlänge der Fluoreszenz
$\lambda$ -Scan	Modus eines CLSM: Fluoreszenzemissionsspektrum einer ROI bei einer vorgegebenen Anregungswellenlänge
MTT	3-[4,5-dimethyl-thiazolyl-2]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NIR	nahes Infrarot
NT	Neotetrazolium 2,2'-[p-diphenylen]-bis-[3,5-diphenyl]tetrazolium chlorid
PAP	Peroxidase-antiPeroxidase
PB	Phosphatpuffer
PO	Peroxidase
RIA	Radioimmunoassays
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
S/N-Verhältnis	signal to noise
Stokes-Shift	Differenz zwischen Exzitations- und Emissionsmaximum
Target	Zielstruktur
TBS	Tris Buffered Saline
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBT	Tetra-nitro BT
TNTTC	2,3,5-tri[p-nitrophenyl]-tetrazolium bromid
TRITC/TMRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
TTC	Triphenyl Tetrazolium Chlorid
YT	2,2'-di-[3-nitrophenyl]-5,5'-dimethyl-3,3'-[4,4'-biphenylen]-ditetrazolium chloride

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>10</b>
2.1.	Allgemeines	10
2.2.	Enzymhistochemie	11
2.3.	Affinitätshistochemie	12
2.3.1.	Immuno-Assays (IA)	12
2.3.1.1.	Radio-IA	15
2.3.1.2.	Fluoreszenz-IA	15
2.3.1.3.	Enzym-IA	16
2.3.1.3.1.	Chromogene Substrate für den Nachweis von PO	17
2.3.1.3.2.	Klassische Fluorochrome für den Nachweis von PO	18
2.3.1.3.3.	Neue Reaktivfluorochrome für den Nachweis von PO	19
2.4.	Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie	20
<b>3.</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>Methodik.....</b>	<b>24</b>
4.1.	Material	24
4.1.1.	Versuchstiere	24
4.1.2.	Gewebe für die Immunhistochemie	24
4.1.3.	Tumormaterial	25
4.1.4.	Geräte	25
4.1.5.	Antikörper/ABC-Kit	25
4.1.6.	Chemikalien	26
4.1.7.	Puffer/Lösungen	27
4.2.	Methoden	29
4.2.1.	Immunhistochemie	29
4.2.2.	Fluoreszenzmikroskopie	31
4.2.3.	Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie	31
4.2.4.	Spektral-Analytik	31

<b>5.</b>	<b>Testmodell .....</b>	<b>32</b>
<b>6.</b>	<b>Methodische Optimierung .....</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
	8.1. Neue Reaktivfluorochrome und ihre Eigenschaften in Einzelsystemen	68
	8.2. Simultane Trichromfärbungen	68
	8.3. Mikrowellen-Inkubation	70
	8.4. Histopathologische Diagnostik	70
	8.5. Struktur – Eigenschafts – Beziehungen eingesetzter Farbstoffe	71
<b>9.</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>11.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>

## 1. Zusammenfassung

Immunologische Assays besitzen eine herausragende Bedeutung für den Nachweis spezifischer molekularer Wechselwirkungen. Aufgrund der hohen Anforderungen an die Visualisierung dieser Wechselwirkungen haben sich besonders lumineszente Marker als sensitive und spezifische Detektionswerkzeuge erwiesen. Der Nachweis von peroxidatischer Aktivität zählt zu den klassischen und am meisten bearbeiteten bioanalytischen Aufgabenstellungen. Im Gegensatz zur großen Bandbreite etablierter chromogener Substrate für die Histologie gab es bislang nur ein Fluoreszenz-Verfahren, welches auf Fluorochrom-Tyramin-Konjugaten („Tyramide“) beruht.

Inzwischen wurden im Institut für Anatomie/Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena neuartige Fluoreszenzmarker für PO entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit galt es, diese neuen Reaktivfluorochrome für den Nachweis immungebundener Peroxidase (PO) in fixierten Zellen und Geweben für die Anwendung in der Immunhistochemie, insbesondere für die multichrome Simultandarstellung mehrerer Targets, zu testen und Anwendungen zu optimieren, um diese letztlich auch für breitere Anwendungen allgemein zu etablieren.

Unter Verwendung der ABC-Methode und einer iterativ optimierten Inkubationsvorschrift zeichnen sich die neudesignten Fluorochrome durch exzellente Lokalisation und Sensitivität, herausragende Photostabilität und minimalen Background aus. Ausgehend von diesen Eigenschaften lassen sich durch Kombinationen selektierter Substrate Mehrfachfärbungen bis hin zur simultanen Darstellungen dreier verschiedener Targets bei einer Anregungswellenlänge realisieren.

Mit Hilfe der confocalen Laser-Scanning-Mikroskopie wurden Eigenschaften ausgewählter Substrate und Trichromfärbungen (im Bezug auf spektrale Eigenschaften, Erhalt der Spezifität der Einzelsysteme, cross-talk) näher charakterisiert und objektiviert. Die spektralen Eigenschaften der einzelnen Substrate sind innerhalb eines und zwischen den Organen identisch. Die Färbungen sind hochspezifisch wobei der generelle als auch der jeweils Farbstoff-induzierte (Auftreten vom Emissionsmaxima) Background minimal ist. In den simultanen



Trichromfärbungen zeigen sich identische Eigenschaften für den grün- und rot emittierenden Farbstoff, wie sie in den Einzelfärbungen nachgewiesen sind. Der jeweils gelb emittierende Farbstoff verschiebt sein Emissionsmaximum im Vergleich zu den Einzelmarkierungen in Richtung langwelligeren Bereich. Dies führt allerdings in der Regel zu einer besseren Differenzierung zwischen grün- und gelb markierten Targets, da die Emissionsmaxima sonst eng beieinander liegen.

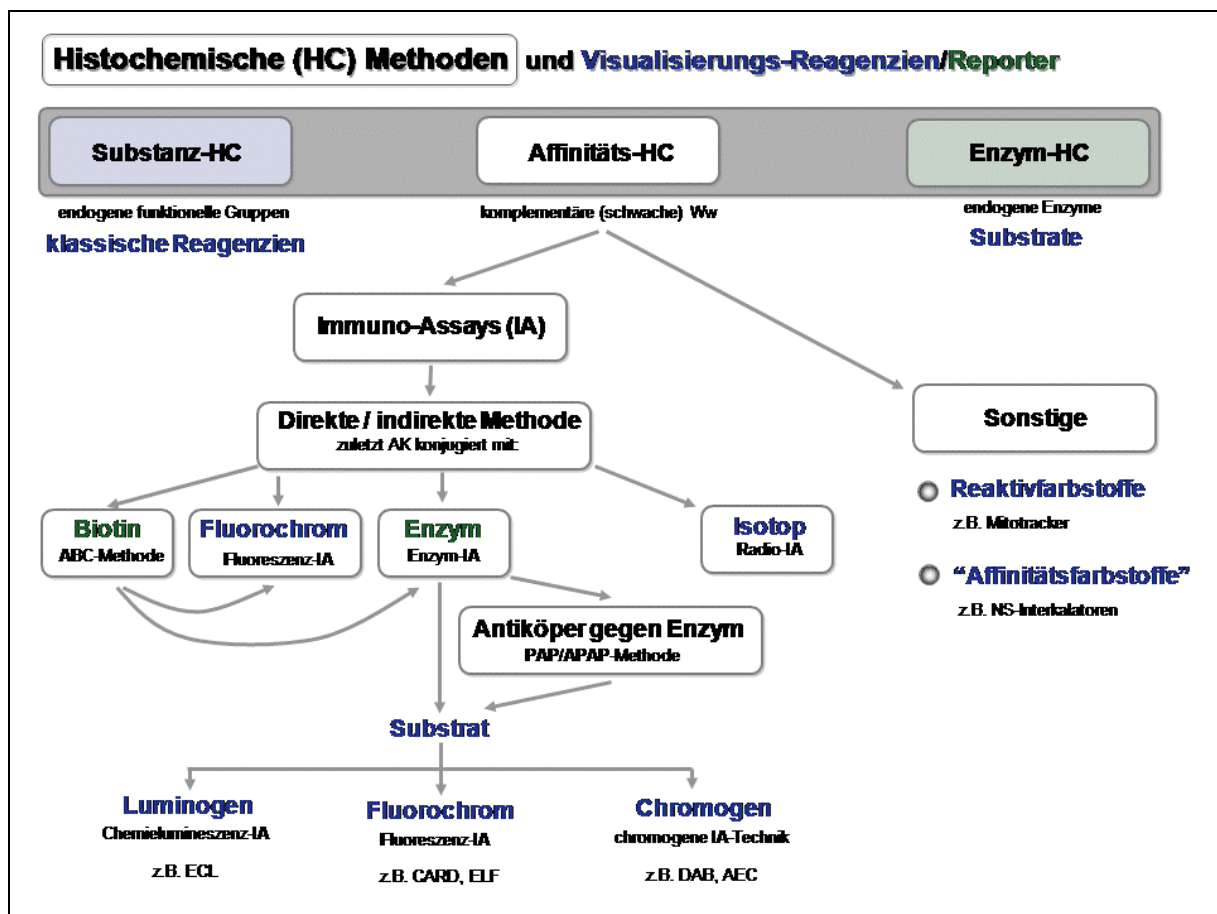
Die neuen fluoreszenten Substrate sind damit hoch potent für den Nachweis peroxidatischer Aktivität in Zellen und Geweben. Im Gegensatz zu den etablierten Tyramin-Fluorochrom-Konjugaten, welche Fluorochrom-Konjugate mit einem Spacer darstellen, vereinigen sie Anker- und Reporter Funktion in einem einzigen  $\pi$ -System. Damit stellen die neuen Substrate zugleich die derzeit kleinsten Substanzen für den Fluoreszenz-Nachweis von PO dar. Durch ihre hervorragenden Eigenschaften und die relativ breitbandige Fluoreszenzanregung und Emission, ergibt sich die Möglichkeit, unter Selektion geeigneter Substrate und Ausnutzung halochromer Effekte, simultane Trichromfärbungen mit einer einzigen Fluoreszenzanregungswelle zu realisieren. Diese lassen sich auch, wie hier gezeigt werden konnte, in die klinische Diagnostik von verschiedenen Karzinomen übertragen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Allgemeines

Lichtmikroskopische (analytische) Techniken nehmen gegenwärtig einen hohen Stellenwert in der Grundlagenforschung sowie in der angewandten klinischen Medizin ein. Für letztere hat sich insbesondere die histopathologische Diagnostik, z.B. von Biopatschnitten, zu einer Domäne lichtmikroskopischer und histochemischer Methoden entwickelt. Seit François-Vincent Raspail (1794-1878), der als Begründer der Histochemie gilt, wurden optische Abbildungssysteme und Verfahren immer weiterentwickelt und ermöglichen uns heute, mit höchster Sensitivität Targets nachzuweisen und mit hoher Lokalisationstreue abzubilden.

Histochemische Verfahren (**Abb. 1**) lassen sich in drei Gebiete unterteilen, die Substanz-, die Enzym- und die Affinitätshistochemie. Eine weitere Einteilung der



**Abb. 1** Überblick über histochemische Methoden

Verfahren ist in transmissions-lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Techniken möglich. Der folgende Abriss ist ein Versuch, beiden Betrachtungsweisen gerecht zu werden.

## 2.2. Enzymhistochemie

Im Gegensatz zur Substanzhistochemie, die zum Nachweis endogener funktioneller Gruppen (und damit von „Substanzen“) dient, lassen sich mit der Enzymhistochemie (eingeführt durch Gomori 1939) endogene Enzyme und damit mit deren katalytischer Aktivität im Zusammenhang stehende Prozesse darstellen und lokalisieren.

Von großer Bedeutung sind hydrolytische Enzyme wie alkalische Phosphatase, reduzierende Enzyme und Oxidasen.

Die Detektion der alkalischen Phosphatase (AP) ist in enzymhistochemischen Anwendungen weit verbreitet (Nachweis neoplastischer Zellen, Osteoblasten-Differenzierung u.a.). Die erste histochemische Lokalisation gelang mit der Metall-Präzipitationsmethode (Gomori 1939 + 1952, Takamatsu 1939). Die in der primären Reaktion vom Substrat abgespaltenen Phosphat-Anionen werden in einer zweiten Reaktion von im Inkubationsmedium enthaltenen Metall-Ionen (Capturing, z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Pb}^{2+}$ ) abgefangen. Das präzipitierte, unlösliche Metall-Phosphat muss in einem dritten Schritt (Transformations-/Visualisierungsreaktion) in eine sichtbare Verbindung umgewandelt werden (van Norden und Frederiks 1992). Nachteile dieser Umwandlungsreaktionen, wie Diffusion und Verlust von Reaktionsprodukt oder Bildung unspezifischer Präzipitate, erschweren die exakte Lokalisation (Moses *et al.* 1966, Mayahara und Ogawa 1968 + 1980, van Duijn 1991). Desweiteren stehen Azokupplung, Indigo- und Tetrazolium-Methode zur Verfügung. 1980 beschrieb Veenhuis *et al.* zum ersten Mal die Anwendung von Cer-Ionen ( $\text{Ce}^{3+}$ ) als Capture-Agens zur Darstellung von Phosphatasen. Solche Markierungen lassen sich auch mittels Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie betrachten (Halbhuber *et al.* 1994 + 1996). Zusätzlich ist AP-Aktivität auch ein nützliches Werkzeug für immunhistochemische Anwendungen (Halbhuber *et al.* 2002).

Für reduzierende Enzyme sind eine Reihe von Tetrazolium Salze etabliert. Als Erstes kam TTC (Triphenyl Tetrazolium Chlorid) zum Einsatz. Sein Reduktionsprodukt, ein rotes Monoformazan, hat den Nachteil eines geringen Farbkontrastes und diffundiert, so dass eine exakte Lokalisation des entsprechenden Target-Enzyms nicht möglich ist. Bestrebungen, die Färbungen zu optimieren, führten zu den Weiterentwicklungen wie NT/Neotetrazolium (Antopol *et al.* 1948), BT/Blue Tetrazolium (Rutenburg *et al.* 1950), INT (Atkinson *et al.* 1950), Nitro-BT (Tsou *et al.* 1956), Tetra-nitro BT/TNBT (Tsou *et al.* 1956, Rosa und Tsou 1963), MTT (Pearse 1957) und YT (Jones 1969). Seidler und Kunde (1969) führten TNTTC, Half Nitro-BT und Half TNBT ein. Desweiteren ist es auch möglich, bestimmte Formazane mit entsprechenden funktionellen Gruppen in die entsprechenden Metall-Chelate (vor allem  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) zu überführen, die z.T. weniger diffusibel sind (Monotetrazolium-Metall Chelat Methode) (Pearse 1972). Andere Möglichkeiten bieten die Kaliumtellurit- ( $\text{K}_2\text{TeO}_3$ ) und die Ferrizyanid-Trapping-Technik (Wohlrab/Seidler/Kunze 1979).

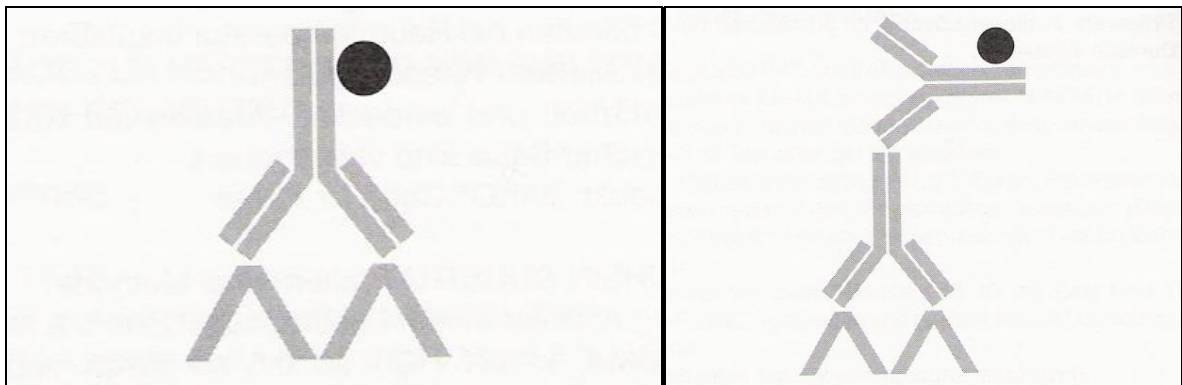
Für den chromogenen Nachweis von Oxidasen und Peroxidase gibt es folgende wichtige Vertreter: Benzidinderivate und weitere aromatische Aminederivate wie 3-Amino-N-ethylcarbazol, Phenolderivate und bestimmte Leuco-Farbstoffe, zu denen auch Indolderivate gehören (Pearse 1972, van der Ploeg und van Duijn 1964 a+b). Durch die Oxidation von Benzidinen wie DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Graham und Karnovsky 1966) entsteht ein braunes Präzipitat.  $\alpha$ -Naphthol liefert ein rötliches Produkt (Graham 1916, Ritter und Oleson 1947, Gomori 1953). AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) (Graham *et al.* 1965) präzipitiert ebenfalls rot bis rotbraun, ist aber weniger sensitiv als Benzidine. Da die Peroxidase/Meerrettichperoxidase (HRP) auch in Enzymimmunoassays (EIA) eine wesentliche Rolle spielt, wird sie dort noch einmal beleuchtet und auf in diesem Zusammenhang besonders wichtige Fluoreszenztechniken eingegangen.

## **2.3. Affinitätshistochemie**

### **2.3.1. Immuno-Assays (IA)**

Affinitäts-basierende Methoden sind für die Detektion molekularer Strukturen in Zellen und Geweben von größter Bedeutung. Sie beruhen alle auf komplementären

schwachen intermolekularen Wechselwirkungen. Das wichtigste Prinzip hierbei ist die spezifische Erkennung eines bestimmten Epitops eines Proteins durch einen Antikörper. Mit dem Verfahren von Köhler und Milstein zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen beliebige Antigene ergibt sich ein enormes Spektrum nachweisbarer Targets (Köhler und Milstein 1975). Eine hohe Spezifität wird durch die hohe Affinitätskonstante zwischen Antigen und Antikörper von  $10^{11}$ - $10^{12}$  l/mol (Diamandis 1990) erreicht. Ag-Ak Interaktionen sind nicht kovalent, sondern werden über ionische- und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte realisiert. Um diese spezifische Erkennungsreaktion „sichtbar“ zu machen, werden die verwendeten Antikörper mit bestimmten Substanzen markiert. Reiner (1930) zeigte als erster, dass es möglich ist, Moleküle an Proteine (Ig) zu binden, ohne deren Funktion zu beeinträchtigen. Dieses Prinzip bildet die Grundlage für immunhistochemische Detektionsverfahren. Hierbei lassen sich **direkte** von **indirekten Methoden** unterscheiden (**Abb. 2**).

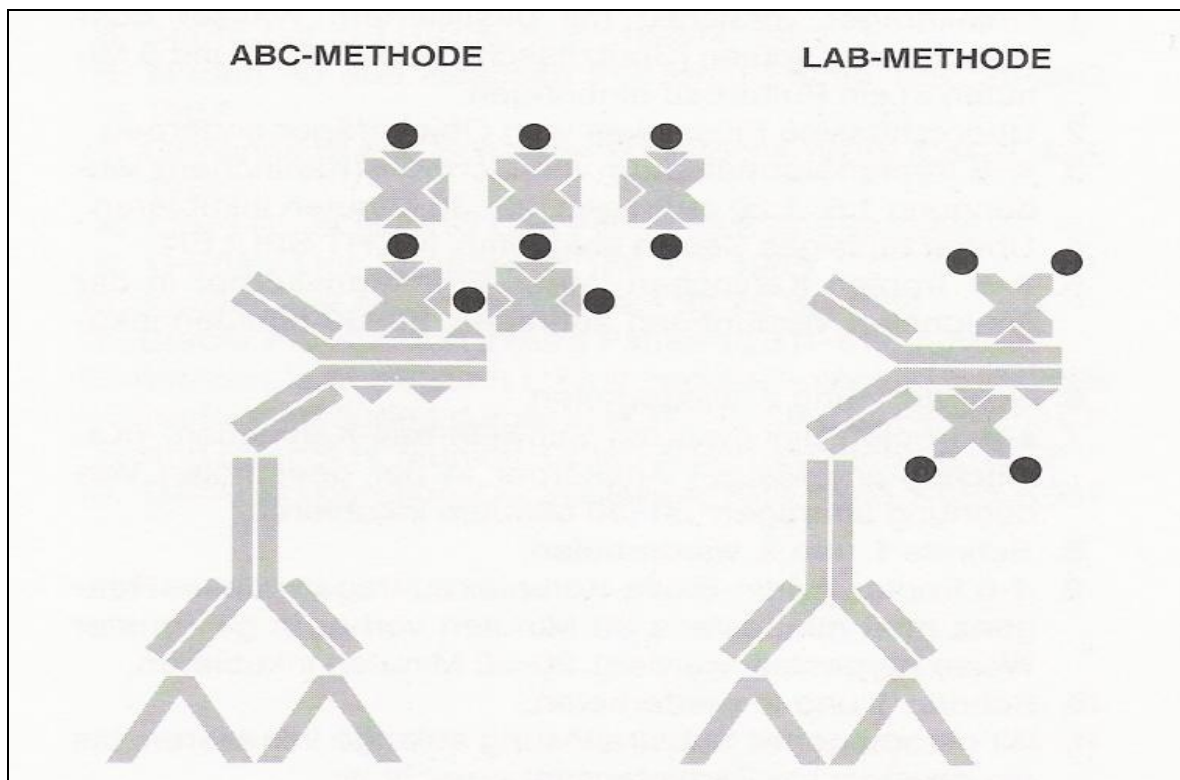


**Abb. 2** Gegenüberstellung von direkter (links) und indirekter Methode (rechts) für Immuno-Assays. Bildquelle: Naish 1989 und Bourne 1992; Handbuch immunchemischer Färbemethoden.

Bei ersterer ist ein Primärantikörper direkt mit einem Signalgeber markiert. Im Gegensatz dazu folgt bei indirekten Immuno-Assays nach aufgetragenem Primärantikörper ein markierter (Visualisierungs-Reagenz/Reporter) Sekundärantikörper der an das freie  $F_c$ -Fragment des Primärantikörpers bindet. Neben der höheren Zeitintensivität bietet diese Methode allerdings eine größere Flexibilität, da eine Vielzahl von Primärantikörpern mit demselben Sekundärantikörper erfasst werden können. Außerdem kommt es zur

Signalverstärkung, da mehrere Sekundärantikörper mit Epitopen des Primärantikörpers reagieren. Nachteilig können Unspezifitäten durch Kreuzreaktionen mit endogenen Immunglobulinen auftreten. Die Möglichkeiten der Visualisierung von IAs werden nachfolgend charakterisiert.

Als Visualisierungs-Reagenz/Reporter existieren (gekoppelt an Ak) Isotope, Fluorochrome, Enzyme oder Biotin. Die ersten drei Varianten werden anschließend noch erläutert. Biotinylierte Antikörper können anschließend markiertes Avidin (LAB-Methode) oder einen Avidin-Biotin-Komplex (*ABC Technik*) binden (vergleiche **Abb. 1, 3**). Die ABC-Technik, welche hier angewandt wurde, wird seit mehreren Jahren verwendet und nimmt eine wichtige Rolle in verschiedenen Biotechnologiebereichen ein (Diamandis und Christopoulos 1991).



**Abb. 3** ABC-Methode und LAB-Methode im Überblick. Bildquelle: Naish 1989 und Bourne 1992; Handbuch immunchemischer Färbemethoden.

Diese Methode nutzt die außergewöhnliche Spezifität und hohe Affinität ( $10^{15}$  l/mol) von Avidin/Streptavidin für Biotin (Diamandis 1990). Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Avidin (67 kDa, Glykoprotein) und Streptavidin sind sehr

stabile Moleküle, welche auch unter drastischen Reaktionsbedingungen (pH-Schwankungen, chelatropen Reagenzien, Waschungen) ihre Bindungsaktivität zu Biotin behalten. Da Biotin ein relativ kleines Molekulargewicht (244,31 Da) hat, beeinflusst es in den meisten Fällen nicht die Antikörperbindung, Enzymkatalyse oder die biologische Aktivität anderer Makromoleküle (Diamandis und Christopoulos 1991). Kritisch kann gelegentlich endogen in Zellen und Geweben auftretendes Biotin sein. Das Biotin im ABC-Komplex kann entweder mit einem Fluorochrom oder Enzym (hier HPO) markiert sein. Je nach dem läuft diese Methode als Fluoreszenz- oder Enzym-IA weiter.

#### **2.3.1.1. Radio-IA**

Bei *Radio-IAs (RIA)* werden *Isotope* (gekoppelt an Ak) als Visualisierungs-Reagenzien verwendet (vergleiche **Abb. 1**). Diese Methode hat sich ab den 1950-er Jahren zu einem entscheidenden und nunmehr klassischen Instrument in der quantitativen *in vitro*-Diagnostik entwickelt (Mayer und Neuenhöfer 1994). RIAs werden zunehmend durch Fluoreszenzimmunoassays (FIA) und Enzymimmunoassays (EIA) ersetzt, da sie oft weniger empfindlich bzw. ortsauflösend und auch teurer sind, als auch eine potentielle Gefahr für Personal und Umwelt darstellen (z.B. Problem „Handling“).

#### **2.3.1.2. Fluoreszenz-IA**

Fluorochrome nehmen eine herausragende Stellung als Visualisierungs-Reagenzien durch ihre hohe Sensitivität und hervorragende visuelle Darstellbarkeit ein (vergleiche **Abb. 1**). Albert Coons (Coons *et al.* 1941) demonstrierte als erster die Möglichkeit der Lokalisation von Gewebsstrukturen/Substanzen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Alternativ zu Fluoreszein-Labels wie Fluoreszein-4-isocyanat (Coons *et al.* 1942, Coons und Kaplan 1950) und FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) (Riggs *et al.* 1960) befassten sich Arbeiten von Weber (1952), Laurence (1952), Redetski (1958) und Hansen (1964) mit DANSYL-Konjugaten. Eine weitere Gruppe stellen RhodaminB-Derivate wie Rhodaminisocyanat (Silverstein 1957),

Tetramethylrhodaminisocyanat (Hiramoto *et al.* 1958), Rhodaminisothiocyanat und TRITC/TMRITC (Tetramethylrhodaminisothiocyanat) (Riggs *et al.* 1960) dar. Letzteres ist einer der gängigsten klassischen roten Fluoreszenz-Marker. Desweiteren existieren Disulphonate von Rhodamin B (Chadwick *et al.* 1958 a+b), die 3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulphonsäure (Uehleke 1958) und fluoreszente Metall-Chelate. Diese klassischen Farbstoffe werden in zunehmenden Maß durch spektralmaßgeschneiderte konjugierbare Farbstoffe ersetzt. Dazu zählen die z.Z. (noch) marktbeherrschenden Alexa-Farbstoffe, die zumindest im Prinzip ein spektral fein gerastertes Baukasten-System darstellen. Fluorochrome, die als Substrat für Enzyme fungieren und dementsprechend Reaktivfarbstoffe sein müssen, werden im Abschnitt über Enzym-IAs behandelt. Sie stellen das Kernstück dieser Arbeit dar.

### 2.3.1.3. Enzym-IA

Besonders enzymbasierte Lumineszenztechniken (EIAs) sind zurzeit die sensitivsten diagnostischen Hilfsmittel (Mayer und Neuenhöfer 1994). Über HRP-, AP- oder GAL-markierte Antikörper können Substrate (Luminogene/Luminol, Chromogene oder Fluorochrome) im Gewebe verankert werden (vergleiche **Abb. 1**). Enzyme sind als Reporter in IAs so attraktiv, da je nach katalytischer Aktivität ein Äquivalent Enzym eine Vielzahl an Äquivalenten eines spezifischen Reaktionsproduktes erzeugen kann (Diamandis 1990). Ist dieses Produkt ein Farbstoff, wird somit gegenüber direkten Antikörper-Farbstoff-Konjugaten ein signifikanter Verstärkungseffekt des finalen optischen Signales erzielt. Die größte Bedeutung als Markerenzym kommt der HRP zu, da sie stabil und preiswert ist und auf Grund ihrer Kleinheit (40 KD) am wenigsten die Bindung von Antikörpern mit dem Target beeinflusst (Krieg und Halbhuber 2003, Krieg 2006).

Eine Sonderform von Enzym-IAs stellen PAP und APAAP dar. Bei dieser Methode kommen präformierte Enzym-anti-Enzym-Immunkomplexe zum Einsatz. Ein verwendeter Brückenantikörper vernetzt diese Komplexe mit dem zuvor aufgetragenen, gegen das Target gerichteten, Primärantikörper. Der Substratumsatz erfolgt über das jeweils im Komplex befindliche Enzym (vergleiche **Abb. 1**).



### 2.3.1.3.1. Chromogene Substrate für den Nachweis von PO

Chromogene (aromatische Amine und Phenole) sind die ältesten Substrate für die Detektion von Peroxidase, jedoch der Fluoreszenz in ihrer Empfindlichkeit unterlegen (Mayer und Neuenhöfer 1994, Krieg 2006). Chromogene Substrate bilden Präzipitate (Oligo- bzw. Polykondensationsprodukte) und haben bis auf wenige Ausnahmen (siehe unten) typischerweise keine Fluoreszenzeigenschaften (Krieg *et al.* 2001 + 2006). Tyramin und verwandte 4-hydroxyphenylalkyl Derivate mit geringer Reaktivität polykondensieren in Gegenwart von PO/Wasserstoffperoxid nicht, sondern bilden Dimere mit sich selbst oder ähnlichen Komponenten in Proteinen. Diese Dimere sind schwach fluoreszent (Gross und Sizer 1959), können aber im Rahmen der CARD-Technik durch die Konjugation mit Fluorochromen als „Fluoreszenz-Vehikel“ eingesetzt werden (CARD = catalyzed reporter deposition).

Bewährte Chromogene für den Nachweis von Peroxidase sind: DAB (3,3'-Diaminobenzidin) (Graham und Karnovsky 1966), AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) (Graham *et al.* 1965), das *Hanker-Yates*-Reagenz (p-Phenylendiamin/Brenzcatechin) und TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin). Durch die braune Grundfarbe dieser Präzipitate lassen sich kaum gleichzeitige Darstellungen verschiedener peroxidasegekoppelter Antikörper realisieren (Hanker *et al.* 1972, Hanker 1979, Chayen und Bitensky 1991, Krieg 2006). Durch metallkatalytische Effekte (z.B. Nickel-/Cobald-/Kupfersalze) kann die Empfindlichkeit von DAB gesteigert oder die Farbgebung beeinflusst werden, indem es als zweizähniger Chelator wirkt (Hsu und Soban 1982, Hancock 1986, Karnovsky 1994, Halbhuber *et al.* 1996). Auch andere Metalladditive wie  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Ce}^{3+}$  können chromogene Reaktionen intensivieren. Diese Tatsache führte zur Entwicklung leistungsfähiger chromogener Substrate, welche durch die Einführung von Chelatzentren durch intramolekular vermittelte Metallkatalyse sowohl in ihrer Reaktivität als auch in ihren physikochemischen Eigenschaften steuerbar sind (Krieg *et al.* 2000 + 2001, Krieg 2006). Im Allgemeinen werden Reaktivität und die Wahrscheinlichkeit für Polykondensationen (chromogenes Verhalten) von Substraten durch viele Hydroxy/Aminosubstituenten erhöht (Krieg und Halbhuber 2004). Ein Chromogen, dessen spezifisches Produkt alternativ auch mit gepulsten NIR-Lasern zur Fluoreszenz anregbar ist, ist *JenChrom<sup>TM</sup> px blue* (Krieg 2006). Neben der DAB-Methode nach Graham und

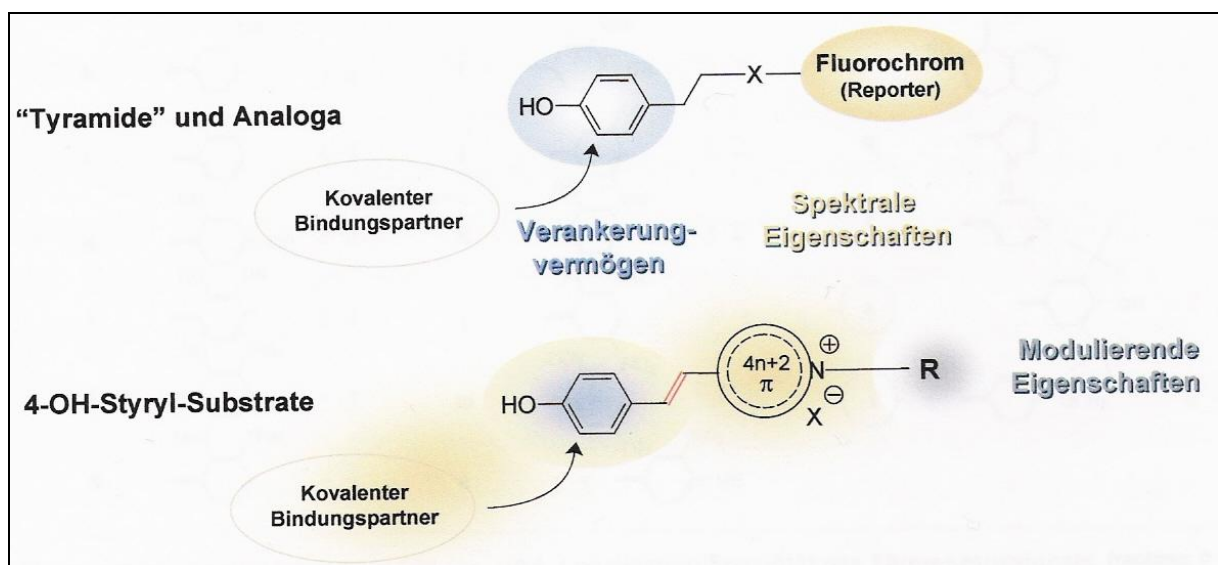
Karnovsky lassen sich auch bestimmte sekundäre Amine zur elektronenmikroskopischen Darstellung von peroxidatischer Aktivität verwenden (Krieg 2006).

#### **2.3.1.3.2. Klassische Fluorochrome für den Nachweis von PO**

Fluorochrome sind mit Abstand die wichtigsten Detektions-Sonden in Medizin und Biowissenschaften (Mathies und Stryer 1986, Diamandis 1990). Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Peroxidase (in Enzym-IA) existieren niedrig substituierte 4-Hydroxyphenylalkyl-Derivate wie 4-Hydroxyphenylelessigsäure, Homovanillinsäure und Tyramin für fluorometrische Bestimmungen in homogener Phase. Die etablierten „Tyramide“ (mit Tyramin konjugierte Fluorochrome) werden zur Lokalisation von PO in Zellen und Geweben eingesetzt. Bevorzugter Reaktionsweg hier ist die Hetero-Dimerisierung und damit die kovalente Verankerung des Konjugates im Gewebe (CARD- [= catalyzed reporter deposition] Technik) (Bobrow *et al.* 1989 + 1992, Wasielewski *et al.* 1997). Tyramide bestehen aus einem Anker- und einem Reporterteil, wobei der Reporter (= Farbstoff) während der oxidativen Verankerung unverändert bleibt. Cy3.29-Tyramide können die Empfindlichkeit noch einmal gegenüber herkömmlichen Tyramiden verbessern (Chao *et al.* 1996). Der starke Background lässt sich durch Blockreagenzien reduzieren (Kim *et al.* 2003). Nahezu alle „Tyramid“-basierten Fluoreszenzmethoden erhöhen die Sensitivität im Vergleich zur Fluorochrom-Antikörper-Konjugat-Immunofluoreszenz auf Grund des enzymvermittelten Amplifikationseffektes (van Gijlswijk *et al.* 1997). Alexa<sup>TM</sup>-Tyramide haben hohe Quantenausbeuten und eine verbesserte Photostabilität gegenüber Tyramin-Konjugaten wie z.B. mit AMCA (7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure), FITC und TRITC. Sie stellen somit die leistungsfähigste Fluoreszenzmethode zum Peroxidasenachweis dar (Speel *et al.* 1997).

### 2.3.1.3.3. Neue Reaktivfluorochrome für den Nachweis von PO

Die an unserem Institut (Institut für Anatomie/Anatomie II der FSU Jena) entwickelten oxidativ-selbstankernden *Reaktivfluorochrome* (4-Hydroxy-Styrylderivate, sowie Aminopyrene und Aminostilbene), können in der Gegenwart von Peroxidase nach ihrer Aktivierung kovalent im Gewebe verankert werden. Im Gegensatz zu Tyramin-Fluorochrom-Konjugaten sind bei diesen Farbstoffen Anker- und Reporterfunktion nicht voneinander getrennt (Krieg und Halbhuber 2004). Das lässt u.a. erwarten, dass sich die spektralen Eigenschaften von Substrat und spezifisch gekoppelten Reaktionsprodukt mehr unterscheiden als bei Tyramiden mit „passiv mitgeschleppter“ Farbstoffsonde und im Endeffekt in einem verbesserten S/N-Verhältnis (Signal to Noise) münden. **Abb. 4** zeigt eine Gegenüberstellung dieser Substanzen.



**Abb. 4** Struktur von Tyramiden und Styrylderivaten (Krieg 2006).

Tatsächlich liefern die neudesignierten Reaktivfluorochrome exzellente Fluoreszenzintensität/Spezifität, Lokalisationsschärfe und minimale Hintergrundfluoreszenz. Die kovalente Kopplung an umgebende Nukleophile erfolgt dabei ebenfalls über die freien *ortho*-Positionen zur OH-Gruppe. Dies gilt auch für bestimmte Phenolester und Dialkylamino-Styrylsubstrate. Die spektralen Eigenschaften oben genannter Farbstoffe werden auch vom  $\pi$ -System des Kopplungspartners und häufig vom pH bestimmt. Vielfach werden mit wachsender Größe des  $\pi$ -Systems Absorptions- und Emissionsmaxima bathochrom verschoben.

Durch Ausnutzung halochromer Effekte (unterschiedlicher pH-Einfluß auf Substrate mit OH-, Me<sub>2</sub>N- und Phenolester-Gruppierungen) und spektraler Eigenschaften (unterschiedliche heterocyclische  $\pi$ -Systeme) ergibt sich die Möglichkeit der simultanen multichromen Darstellung mehrerer Targets bei einer einzigen Anregungswellenlänge (Krieg 2006, Krieg *et al.* 2008).

## **2.4. Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie**

Die CLSM, im Zusammenhang mit der Entwicklung neuer Farbstoffe, hat sowohl die *in-vitro*- als auch die *in-vivo*-Visualisierung mikroskopischer Proben enorm verbessert und stellt damit ein fundamentales Werkzeug für die Untersuchung der Verteilung und Dynamik von Proteinen in Zellen und Geweben dar. Bei der Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie werden Gewebeschnitte mit einem fokussierten Strahl monochromatischen Lichtes eines Lasers gescannt. Das Ausblenden nicht-fokussierter Ebenen mit Hilfe des *pinhole* führt zu einer verbesserten Bildqualität, im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie (Roderfeld *et al.* 2003). Mit einer axialen Auflösung von 650 nm (White *et al.* 1989) stellt diese Technik eine Verbindung zwischen konventioneller Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie dar. Das Prinzip der CLSM bietet mehr Möglichkeiten der Bildanalyse und Präsentation (Cheng und Summers 1988, Pluta 1889, Rigaut *et al.* 1993, Gu und Sheppard 1993, Brakenhoff *et al.* 1988). Die Vorteile dieser Methode gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie bestehen in der Elimination von Informationen des umgebenden Gewebes, der Möglichkeit der Speicherung und Weiterverarbeitung der Bildinformationen bis hin zur 3-D-Rekonstruktion und vor allem in einer wesentlich größeren Auflösung als bei der Lichtmikroskopie (White *et al.* 1987, Batten und Robinson 1989). Durch den simultanen Einsatz mehrerer Markierungsfarbstoffe lassen sich verschiedene Proteine gleichzeitig untersuchen (Lokalisation und Beziehungen zwischen Molekülen und anderen Zellbestandteilen). Die Anwendung solcher Multifluoreszenzexperimente geht hin bis zum *5D-Imaging* (3D-Fluoreszenzverteilung, zeitliche Ebene und gleichzeitig mehrere Farbstoffe) (Roderfeld *et al.* 2003). Alle diese Techniken haben die Verfügbarkeit entsprechender maßgeschneiderter Fluoreszenzsonden zur Voraussetzung, die

sowohl untereinander, zur eingesetzten Technik und zum analytischen Problem kompatibel sind.

### 3. Ziele der Arbeit

Mit der Entwicklung neuer fluoreszenter Substrate für den Nachweis von peroxidatischer Aktivität entstand die Frage, wie potent diese für die Anwendung in der Immunhistochemie, insbesondere für die multichrome Simultandarstellung mehrerer Targets, sind. Ein wichtiger Schritt in der Validierung ist die Beurteilung von Sensitivität, Spezifität, Background und der Photostabilität. So sollten in der ersten Phase ausgewählte Fluoreszenzfarbstoffe auf diese Eigenschaften hin zunächst in Einfarbstoff-Systemen (nur ein Target) untersucht und die Inkubations- und Auswertebedingungen optimiert werden, um dann sukzessive zu multichromen/multi-Target-Systemen überzugehen.

Dabei stellt sich insbesondere die Frage, inwieweit sich bestimmte Fluorochrome miteinander kombinieren lassen, da simultanes Multitargeting einerseits maximale Überlappung der optimalen Anregungswellenlänge und andererseits möglichst weit auseinanderliegende Emissionsbereiche der einzelnen Farbstoffe erfordert. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, wurden folgende Zielsetzungen bearbeitet:

1. Welche Farbstoffe und Farbstoffkombinationen sind für die Trichromfärbung am geeignetsten
2. In welcher Reihenfolge sind die Antikörper bzw. Farbstoffe einzusetzen
3. Welche Substratkonzentrationen sind notwendig
4. Sind weitere Optimierungen der Inkubationsvorschrift möglich (Pufferzusammensetzung, pH, Additive, ...)

Um ausgewählte Fluorochrome und Trichromfärbungen näher zu charakterisieren, wurden spektrale Untersuchungen am histologischen Präparat ( $\lambda$ -Scans) mit Hilfe eines Confocal-Laser-Scanning-Mikroskops durchgeführt. Neben den Fluoreszenzanalysen in den einzelnen Organen sollten Auswirkungen der Mehrfachinkubation auf die Lokalisations- und Fluoreszenzeigenschaften bei Mehrfachfärbungen untersucht werden.

Um die Brücke zur klinischen Anwendung zu schlagen, galt es, die Anwendbarkeit der optimierten Mehrfachdarstellung von Antigenen an verschiedenen Karzinomentitäten, im Sinne der pathologischen Diagnostik, zu zeigen.

## **4. Methodik**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Versuchstiere**

Das Gewebe für die Immunhistochemie stammt von 12 männlichen Wistar-Ratten des Auszuchtstammes Han:Wistar (SPF). Alle Versuchstiere (Gewicht: 250-600 g) wurden unter standardisierten Bedingungen (18-24 °C, altromin-Haltungsfutter, Wasser ad libitum) gehalten. Folgende Organe wurden verwendet: Zunge, Trachea, Magen, Dünndarm, Leber, Speicheldrüsen, Milz, Niere, Blase, Nebenhoden und Schwanzhaut.

#### **4.1.2. Gewebe für die Immunhistochemie**

Die Ratten wurden mittels Äther unter einer Glasglocke betäubt und anschließend mit einer Schere dekapitiert.

##### Cryostatschnitte

Entnommenes Gewebe wurde in Isopentan (gekühlt mit flüssigem Stickstoff) fixiert, im Cryostat (Leica CM 3000) geschnitten (ca. 5-8 µm) und bei -20 °C aufbewahrt.

##### Paraffinschnitte

Zur Fixierung wurde 2 %-iges Formol verwendet (Dauer 2-3 d, je nach Größe der Organe). Anschließend unter fließendem Leitungswasser gewaschen und in einer ansteigenden Alkoholreihe (50, 60, 70, 80, 96 %, abs.) entwässert (je 2 h). Methylbenzoat wurde als Intermedium verwendet und anschließend das Gewebe mit gesättigter Benzol-Paraffin Lösung durchtränkt. Einbettung in geschmolzenem reinem Paraffin (60 °C, 2 h). 8-12 µm dicke Schnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert) angefertigt.



### Semidünnschnitte

Gefriergetrocknetes Gewebe wurde in Propylenoxid durchtränkt. Anschließend Überführung in eine Mischung aus Propylenoxid-Harz (1:1, 1-2 h RT), Einbettung in Eponharz und Mikrotomie in 1µm dicke Schnitte (Ultracut E; Leica).

#### **4.1.3. Tumormaterial**

Verwendet wurden schockgefrorene Proben verschiedener Karzinomentitäten (Mamma-Ca, Prostata-Ca und orales PE-Ca), welche aus dem Eingangsgut des Institutes für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena stammten.

#### **4.1.4. Geräte**

Im Folgenden sind die wichtigsten Spezialgeräte aufgeführt, ohne die übliche Standardausstattung eines Labors zu berücksichtigen.

Autoklav	SANOclav
Confocal-Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510 META Carl Zeiss Jena
Digitalkamera	Olympus Camedia Digital Camera C-3030 Zoom Olympus C-3040-ADU Olympus U-CMAD3
Feinwaage	Sartorius AG Mechatronic
Fluoreszenzmikroskop	Jenalumar Carl Zeiss Jena
Mikrowelle	Miele Supratronic M752

#### **4.1.5. Antikörper/ABC-Kit**

Materialienname	Firma	Herstellungsort
Vimentin CN: M0725 Clone V9	Dako Cytomation	Dänemark

Desmin CN: M0760 Clone D33	Dako Cytomation	Dänemark
Cytokeratin CN: M3515 Clone AE1/AE3	Dako Cytomation	Dänemark
Polyklonal Rabbit Anti-Mouse IgG biotinylated E 0464	Dako Cytomation	Dänemark
Vectastain ABC Kit Elite	Vector Laboratories	USA

#### 4.1.6. Chemikalien

Materialienname	Firma	Herstellungsort
Abs. Alkohol		
Aceton	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe, Deutschland
CHAPS	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Citronensäure Monohydrat	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Dako Cytomation Pen	Dako Cytomation	Dänemark
DMFA (N,N-Dimethylformamid)	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Entellan	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Gelatin from cold water fish skin, 45% (Fischgelatine/FG)	Sigma	Deisenhofen, Deutschland
Hepes	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Methanol	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
NaCl	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Natriumphosphat dibasisch Dihydrat)	Riedel-de Haën	Seelze, Deutschland
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Sodium Cacodylat Trihydrat	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Fluka Chemie GmbH	Schweiz

Triton X 100	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Tween 20	Fluka Chemie GmbH	Schweiz
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe, Deutschland

#### 4.1.7. Puffer/Lösungen

##### 10x TBS

24,2 g Tris(hydroxymethyl) ( $\approx 0,5$  M)

25,2 g NaCl ( $\approx 6,3$  %)

→ auf 400 ml mit a.d. auffüllen und mit 18 % HCl auf pH 7,4 einstellen

##### 1x TBS

50 ml 10x TBS

→ auf 500 ml mit a.d. auffüllen

##### 0,05 M PB

**0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$**

8,9 g auf 500 ml mit a.d. auffüllen

**0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$**

1,36 g auf 100 ml mit a.d. auffüllen

0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  mit 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  auf pH 8 einstellen und 1:2 verdünnen

##### 10 mM Citratpuffer

0,42 g auf 200 ml mit a.d. auffüllen

→ mit 5 M NaOH auf pH 6 einstellen

##### 0,1 M Hepes

11,9 g auf 500 ml mit a.d. auffüllen

→ mit 5 M NaOH auf pH 8 einstellen

**0,1 M Cacodylatpuffer**

2,24 g Sodium Cacodylate Trihydrate auf 100 ml mit a.d. auffüllen  
→ mit 18 % HCl auf pH 7,4 einstellen

**2 %-iges Formol**

2 g Paraformaldehyd mit 100 ml 0,1 M Cacodylatpuffer aufkochen  
abkühlen lassen  
pH Kontrolle (7,4)

**10 %-ige Fischgelatine (FG)**

2,2 ml 45 %-ige FG auf 10 ml mit a.d. auffüllen

**10 %-ige Triton X 100**

1 ml auf 10 ml mit a.d. auffüllen

**0,5 %-iges Tween 20**

250 µl auf 50 ml mit a.d. auffüllen

**5 %-iges CHAPS**

2,5 g auf 50 ml mit a.d. auffüllen

**Verdünnungslösung für Antikörper**

800 µl TBS

100 µl 10 %-ige FG

100 µl 10 %-iges Triton X 100

Primärantikörper: 1:50

Sekundärantikörper: 1:100

ABC: 1:200 (A und B zu gleichen Anteilen (je 0,5))

**Substrat-Inkubationslösung (1x)**

1 mg Substanz in 1 ml DMFA lösen  
davon 50 µl in eine Lösung aus:

20 ml 0,05 M PB  
200 µl 0,5 %-igem Tween 20  
300 µl 5 %-igem CHAPS  
3,33 µl 30 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

***Blockungslösung für Peroxidase-Restaktivität (0,05 M PB, 10 %-ig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)***

10 ml 30 %-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 20 ml 0,05 M PB

## **4.2. Methoden**

### **4.2.1. Immunhistochemie**

#### Cryostatschnitte

Cryostatschnitte (5-8 µm; siehe 4.1.2.) 1h trocknen und anschließend für 25 min bei Raumtemperatur in 2 %-igem Formol fixieren. Anschließend 5 min mit fließend Wasser und 5 min in a.d. spülen.

#### Paraffinschnitte

Paraffinschnitte (8-12 µm) 2x5 min in Xylol inkubieren und anschließend absteigende Alkoholreihe bis auf 50 % (je 3 min). Präparate mindestens 5 min in a.d. spülen.

#### Semidünnschnitte

Zum Entharzen durchlaufen die Schnitte methanol. NaOH, Benzol-Methanol (1:1) und 2x Aceton (je 2 min für 1 µm dicke Schnitte). Anschließend waschen: 2x TBS (je 10 min) und a.d. (5 min). Objektträger auf Strecktisch trocknen.

#### Optimierte Inkubationsvorschrift für die Monochromfärbung

Nach der spezifischen Vorbehandlung (s.o.), Präparate 15 min bei 120 °C (1 bar) in 10 mM Citratpuffer (pH 6) autoklavieren. Nachdem die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt sind (ca. 2 h), werden sie 2 x 10 min mit TBS (Tris-buffered saline) pH 7,4 gewaschen. Während dieser Zeit wird der Objektträger um das Gewebe herum mit einem Leinentuch abgetrocknet und das Gewebe mit einem Dako Cytomation Pen

„engerahmt“. Primärantikörper (Verdünnung 1:50) auftragen und Inkubation bei 4°C über Nacht im Kühlschrank.

Am nächsten Tag waschen: 3x TBS (je 10 min) und Sekundärantikörper (biotinyliertes anti-mouse IgG, Verdünnung 1:100) auftragen. Inkubation für 40 min und anschließend wieder 3x TBS (je 10 min). ABC (Verdünnung 1:200) auftragen und erneut 40 min inkubieren. Waschen: 3x TBS (je 10 min) und 1x 0,05 M PB (5 min, pH 8). Substanzinkubation für 60 min und erneut 3x waschen mit PB (je 2 min). 3x sauer (1 n HCl) oder 3x alkalisch (0,1 M NaOH) spülen (je 1 min) und für 2 min in abs. Alkohol. Abschließend 3x waschen in Alkohol-Xylol 1:1 (je 2 min) und in Entellan eindecken.

#### Optimierte Inkubationsvorschrift für die Trichromfärbung

Selber Ablauf wie für die Monochromfärbung. Nach Substratinkubation waschen in 0,05 M PB pH 8 (5 min). 20 min blocken in PB (anteilig 10 %-ig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Erneut waschen: PB (5 min) und 3x TBS (je 10 min). Anschließend nächsten Primärantikörper aufbringen, über Nacht bei 4 °C inkubieren.

Nach dem dritten Substrat Inkubation abschließen wie bei der Monochromfärbung. Mit 0,1 n HCl 3x spülen (je 1 min) und in Entellan eindecken.

Die Primärantikörper werden in nachstehender Reihenfolge aufgetragen:

1. Vimentin
2. Desmin
3. Cytokeratin

#### Mikrowellen-Technik

Abkühlungsprozess nach Autoklav ist verkürzt (10 min RT, 10 min 4 °C, 10 min -20 °C). Die erste Primärantikörper-Inkubation (Vimentin) erfolgt in der Mikrowelle (30 min; 80W) gekühlt mit crushed ice (alle 5 min für 2 s einschalten).

Bei Cryostatschnitten Desmin-Ak über Nacht und Cytokeratin-Ak 2 h bei RT. Substrat-Inkubationen erfolgen mit Mikrowelle auf crushed ice (10 min; 80 W; Konz.: 3x/0,5x/0,5x).

Für Paraffinschnitte Desmin- und Cytokeratin-Ak über Nacht und Substrat-Inkubation 1 h bei RT (Konz.: 3x/1x/1,5x).

#### 4.2.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Beurteilung der Schnitte wurde ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet. Folgende Einstellungen kamen zum Einsatz:

Blauanregung:	450 ± 20 nm durch entsprechende Filtersätze (2x KP 490 und B 229; Sperrfilter: G 247)
Grünanregung:	550 ± 20 nm durch entsprechende Filtersätze (2x KP 560, G247 und B 424; Sperrfilter: O 263)

#### 4.2.3. Confocal-Laser-Scanning-Mikroskopie

Um genauere Aussagen über die Emissionsspektren zu bekommen und die Auswertung zu objektivieren wurden Lamdascans am LSM 510 META der Firma Zeiss durchgeführt. Verwendet wurde ein Argon-Ionen Laser mit 488 nm Anregungswellenlänge, Hauptfarbteiler HFT: KP 700/488 und ein Meta-Detektor: 501-704 nm in 10,71 nm Intervallen (= höchste spektrale Auflösung). Als Objektiv wurde das EC-Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC benutzt. Detektor-Gain und Laserleistung wurden optimiert, so dass die Emissionstärke den Intensitätsbereich nicht übersteigt und somit genaue Aussagen über die Maxima der Emissionsspektren zu treffen sind. Für die  $\lambda$ -Scans wurde eine Auflösung von 1024x1024 gewählt und „Average“ auf 4 gesetzt.

#### 4.2.4. Spektral-Analytik

Die  $\lambda$ -Scans wurden anschließend mit der dazugehörigen Software (LSM 5 Image Examiner<sup>®</sup>) ausgewertet und nach Übertragung der Rohdaten in Microsoft<sup>®</sup>-Excel<sup>®</sup> die dazugehörigen Kurven erstellt. Alle Laser-Scanning-Bilder wurden mittels Linear-Unmixing farbcodiert und anschließend in Adobe<sup>®</sup>Photoshop<sup>®</sup>cs lediglich mit der Funktion Tonwertkorrektur nachbearbeitet.

## 5. Testmodell

In unserem Testmodell wurde die ABC-Technik (Enzym-IA) und Primär-Antikörper gegen die Cytofilamente Vimentin, Desmin und Cytokeratin verwendet. Alle Substrate wurden zunächst separat an Cryostatschnitten auf ihre Eigenschaften hin (siehe Ziele der Arbeit) getestet – im Hinblick auf Mehrfachfärbungen vorzugsweise nach entsprechender Filterung vorrangig grün emittierende Farbstoffe mit Vimentin, gelb emittierende mit Desmin und rot emittierende mit Cytokeratin. Ausgewählte Fluorochrome fanden auch an Paraffin- und Semidünnschnitten Anwendung. Für die Trichromfärbungen wurden nur diejenigen Substrate ausgewählt, die sich in den Einfachfärbungen als potentiell erwiesen. Die visuelle Auswertung erfolgte generell mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss.

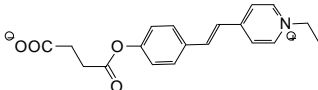
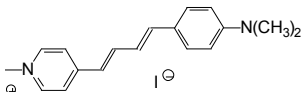
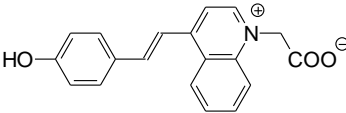
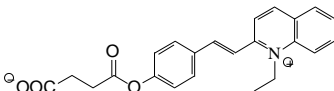
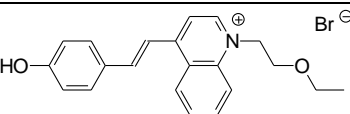
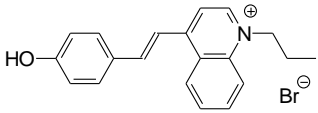
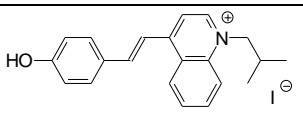
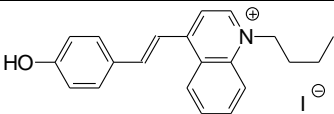
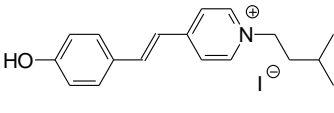
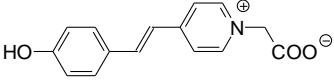
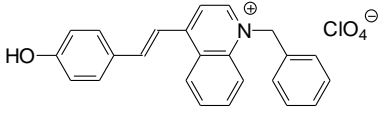
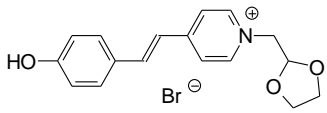


## 6. Methodische Optimierung

Um die Grundlage für effiziente Mehrfachmarkierungen zu legen, galt es zunächst, optimale Inkubationsbedingungen für Farbstoff-Einzelsysteme zu finden. Mit Hinblick auf das angestrebte Multitargeting standen die Parameter Farbgebung, Sensitivität, Lokalisationstreue und unspezifische Backgroundaktivität (minimale Hintergrundfluoreszenz) im Vordergrund. Tab. 1 zeigt die Zusammenstellung der eingesetzten Substrate.

Nummer	Int. Bezeichnung	Nummer	Int. Bezeichnung
<b>I</b>	8.6.1.W05	<b>XIV</b>	12.22.04
<b>II</b>	12.122.1.04	<b>XV</b>	12.37.W04
<b>III</b>	1.18.WR05	<b>XVI</b>	12.55.04
<b>IV</b>	12.29.04	<b>XVII</b>	12.78.04
<b>V</b>	1.9.1.05	<b>XVIII</b>	12.82.04
<b>VI</b>	1.33.1.05	<b>XIX</b>	12.109.W04
<b>VII</b>	1.36.1.05	<b>XX</b>	12.114.P04
<b>VIII</b>	4.1.P05	<b>XXI</b>	12.134.P04
<b>IX</b>	5.6.1.02	<b>XXII</b>	12.135.1.P04
<b>X</b>	8.2.1.05	<b>XXIII</b>	12.150.1.04
<b>XI</b>	8.3.1.05	<b>XXIV</b>	12.152.2.04
<b>XII</b>	8.4.1.05	<b>XXV</b>	26.4.11.04
<b>XIII</b>	10.2.1.05	<b>XXVI</b>	36.3.WM04

**Tab. 1** Zusammenstellung verwendeter Substrate (ausgewählte Formeln siehe Tab. 2). Bei Fluoreszenz-Blauanregung und nach entsprechender Filterung (Langpaß-Filter zur Eliminierung des Anregungslichtes) erscheinen die Fluorochrome **I** und **II** grün emittierend, **III** und **IV** rot emittierend und **V** – **XXVI** gelb emittierend. Getestet wurde anhand von Monochromfärbungen (Cryostatschnitte mit den Cytofilamenten Vimentin [**I**; **II**], Desmin [**V** – **XXVI**] und Cytokeratin [**III**; **IV**] als Targets; Färbung über immungebundene Peroxidase – ABC-Technik) entsprechend der Standard-Arbeitsvorschrift (Substratkonzentration: **1x** entspricht 0,05 mg Substrat in 20 ml Inkubationslösung).

Nummer	chemische Formel
I	
III	
VII	
XI	
XIII	
XIV	
XV	
XVI	
XVIII	
XIX	
XXIII	
XXIV	

**Tab. 2** Chemische Formeln von ausgewählten und in Einfach- und Mehrfachmarkierungen verwendeten Farbstoffen.

Mit dem Ziel, die Mehrfachfärbungen zu optimieren, wurden zunächst einzelne Inkubationsschritte variiert. Dazu gehörten die Wahl der Puffersysteme und deren Konzentrationen, die Optimierung der Blockungslösung für die Peroxidase-Restaktivität, die Reihenfolge der verwendeten Primärantikörper und der eingesetzten Substrate und deren Konzentrationen.

#### Puffersysteme

Zum Einsatz kamen 0,1 M **Hepes**-Puffer und **PB** (0,1 M; 0,05 M; 0,025 M). Die besten Ergebnisse ergab **0,05 M PB** mit verbesserter Sensitivität und Spezifität.

#### Blockungslösung für die Peroxidase-Restaktivität

Variiert wurden dabei Zeitdauer (10 min; 20 min; 30 min) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (3 %; 5 %; 10 %). Die Blockung mit **10 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PB** über **20 min** zeigte verbesserte Spezifität und eine erhöhte Sensitivität des im Roten emittierenden („bathochromen“) Fluorochroms (**III**).

#### Antikörper- und Substratreihenfolge

Mit den drei Primärantikörpern und mit der Substratkombination **I – XIII – III**, stellvertretend für Substrate mit ähnlichen Eigenschaften (siehe Tab. 1), wurden alle Variationsmöglichkeiten ausgetestet. Als am besten geeignet stellte sich die **Primärantikörperreihenfolge Vimentin – Desmin – Cytokeratin** unter Verwendung jeweils eines **grün**- (Vimentin), nachfolgend **gelb**- (Desmin) und im letzten Schritt (Cytokeratin) **rot** - emittierenden Fluorochromes heraus.

#### Substratkonzentrationen

Anhand der Substratkombination **I – XIII – III** wurden exemplarisch Variationen der Substratkonzentration vorgenommen. Als einfache Konzentration (1x) ist die Zusammensetzung der Substrat-Inkubationslösung laut **4.1.7.** (Standard-Arbeitsvorschrift) zu verstehen.

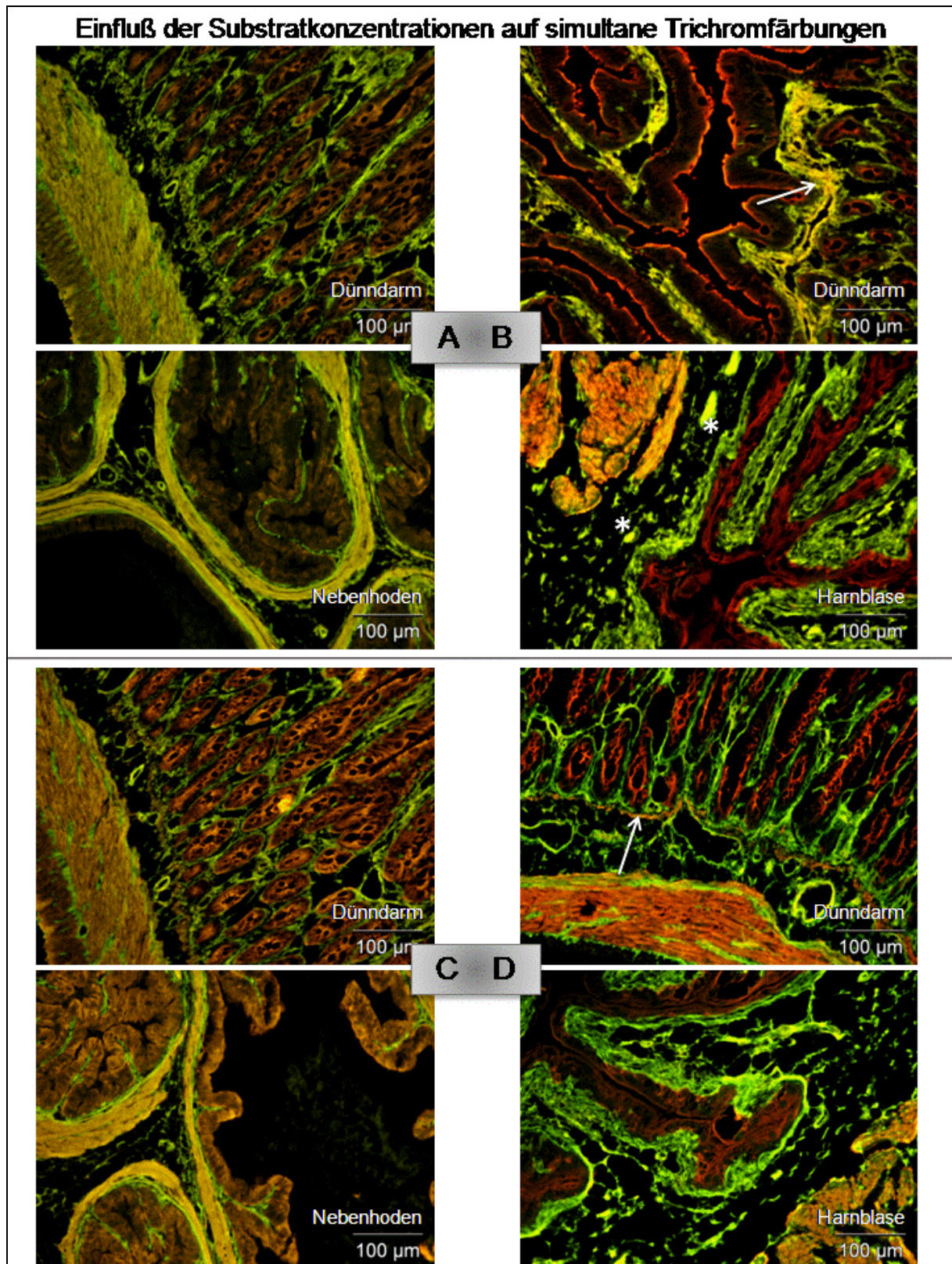
**I** → einfache (≈ 0,05 mg Substrat in 20 ml Inkubationslösung), doppelte (≈ 0,1 mg Substrat in 20 ml) und dreifache Substratkonzentration

**XIII** → halbe und einfache Substratkonzentration

**III** → viertel, halbe, einfache und anderthalb Substratkonzentration

Beste Ergebnisse erzielen **I – 3x** (grün), **XIII – 0,5x** (gelb) und **III – 0,5x** (rot) Konzentration für die Anwendung an Cryostatschnitten. Für Paraffinschnitte ist die Kombination von **I – 3x** (grün), **XIII – 1x** (gelb) und **III – 1,5x** (rot) am geeignetsten. An Semidünnschnitten sind beide Konzentrationsverhältnisse realisierbar. Mit den Konzentrationen **3x – 0,5x – 0,5x** zeigen sich hoch selektive Färbungen, allerdings kommen die Farbstoffe in der Niere in den Konzentrationen **3x – 1x – 1,5x** besser zum tragen und auch die Muskulatur erscheint besser abgrenzbar gegenüber dem grün-emittierenden Vimentin.

Beispielhaft für diesen Optimierungsprozess zeigt **Abb. 5** eine Gegenüberstellung zweier Farbstoffkombinationen mit den Konzentrationsverhältnissen 3x – 1x – 1x und 3x – 0,5x – 0,5x. Werden Desmin und Cytokeratin mit einfacher Substratkonzentration dargestellt (**I – XXIV – III; Abb. 5 A**), lässt sich zwar die Muskularis propria des Dünndarms gut von den anderen Strukturen differenzieren aber die zartere Lamina muskularis mucosae nicht so eindeutig darstellen. Im Nebenhoden lassen sich die Strukturen gut unterscheiden, obwohl der Kontrast zwischen gelb markiertem Desmin und grün markiertem Vimentin deutlicher sein könnte. Insgesamt sind auch die Intensitäten des rot und gelb emittierenden Fluorochroms steigerbar. Werden die Farbstoffe **XXIV** und **III** in der halben Konzentration verwendet (**Abb. 5 B**), zeigen sich mehrere Vorteile. Die Differenzierung der einzelnen Cytofilamente wird bedeutend verbessert, da einerseits das Cytokeratin intensiver und stärker rot dargestellt wird und andererseits sich auch das gelb markierte Desmin intensiver und besser vom grünen Vimentin abgrenzt, bei gleichbleibend überaus geringem Background. Dadurch lassen sich selbst kleine Gefäße und die Lamina muskularis mucosae hervorragend darstellen. Ähnliches gilt für die Farbstoffkombination **I – VII – III (Abb. 5 C + D)**. Das gelb markierte Desmin lässt sich durch seine gelb-orange Fluoreszenz auch schon mit einfacher Substratkonzentration gut abgrenzen. Durch Verwendung der halben Substratkonzentration für Desmin und Cytokeratin lassen sich auch hier die Intensitäten des gelb markierten Desmins steigern und auch das bathochrome Fluochrom erscheint intensiver rot. Auch das grün emittierende Fluorochrom scheint bei beiden Farbstoffkombinationen mit den Konzentrationen 3x – 0,5x – 0,5x an Intensität zu gewinnen.



**Abb. 5** Simultan-Darstellung von Vimentin (grün), Desmin (gelb) und Cytokeratin (rot) in Cryostatschnitten (Jenalumar; Blauanregung). Farbstoffe I – XXIV – III mit Konzentrationsverhältnissen 3x-1x-1x (A) und 3x-0,5x-0,5x (B), I – VII – III mit Konzentrationsverhältnissen 3x-1x-1x (C) und 3x-0,5x-0,5x (D). Beachte: Durch Verwendung gelb und rot emittierender Farbstoffe in halber Konzentration (rechte Bildhälfte; B + D) lässt sich eine deutliche Intensitätssteigerung aller Farbstoffe in der Trichromfärbung erzielen. Dies resultiert in einer besseren Differenzierung der markierten Targets (Lamina muscul. muc.↑ und kl. Gefäße\*).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die simultane Trichromfärbung an Cryostatschnitten mit den Substatkonzentrationen 3x – 0,5x – 0,5x eine optimierte Darstellung der drei Targets mit hoch intensiver, kontrastreicher und damit sehr gut differenzierbarer Fluoreszenz bei minimalem Background liefert. Selbst feine morphologische Strukturen lassen sich auf diese Weise gut darstellen.

Bestrebt nach weiterer Optimierung und Verkürzung der Inkubationsdauer wurden Versuche mit **Mikrowellen-Inkubation** bezogen auf die Antikörper und die Substrate unternommen. Dabei wurden die nachstehenden Variationen bearbeitet. Alle nachstehenden Angaben beziehen sich auf Cryostatschnitte, insofern nicht anders beschrieben.

#### Primärantikörperinkubation (Bsp. Vimentin)

Gesamtdauer	Intervall (in min)	Mikrowelle an (in s)
1 h	5	2
1 h	10	2
1 h	15	2
1 h	20	2
30 min	5	2
30 min	10	2
5 min	1	2
5 min	1	2 (ohne Eis)
30 min		ohne Mikrowelle auf Eis
30 min		ohne Mikrowelle RT

Die Mikrowellen-Inkubation wurde auf Eis und ohne Eis durchgeführt, dies jeweils bei 80 Watt und bei 150 Watt.

#### Sekundärantikörperinkubation

Bei der Inkubation der biotinylierten Sekundärantikörper wurden untersucht: 40 min bei RT und jeweils 10 min, 20 min, 30 min und 40 min mit Mikrowellen-Unterstützung unter Eiskühlung.

Die besten Ergebnisse erzielte die **Primärantikörper**inkubation über **30 min** mit **80 Watt** gekühlt auf **crushed ice** (**alle 5 min für 2 s** einschalten). Für den **Sekundärantikörper** bewährte sich die Inkubation bei **RT** über **40 min** (Standardinkubationsvorschrift).

Für die Mehrfachmarkierungen wurden die Primärantikörper jeweils über Nacht und mit Mikrowelle (30 min; 80 W, s.o.) in allen möglichen Kombinationen untersucht. Für Cytokeratin wurden zusätzlich 30 min, 60 min, 90 min und 2 h (jeweils bei RT) geprüft. Die Substrate wurden bei 1 h und 30 min unter RT, sowie 10 min mit Mikrowelle (auf Eis) inkubiert. Den besten Kompromiss zwischen effizienter Färbung und Reduktion der Inkubationszeit lieferte für Cryostatschnitte:

*Vimentin*-Inkubation (Ak) mit Mikrowelle (30 min; 80 W) gekühlt mit crushed ice (alle 5 min für 2 s einschalten)

*Desmin*-Inkubation (Ak) über Nacht im Kühlschrank (4 °C)

*Cytokeratin*-Inkubation (Ak) 2 h bei RT

Nachfolgende Sekundärantikörper und das ABC-System sind wie in der Standardinkubationsvorschrift 40 min bei RT zu inkubieren. Die Substrat-Inkubation erfolgt mit der Mikrowelle auf crushed ice (10 min; 80 W).

Für Paraffin- und Semidünnschnitte bewährte sich die Standardinkubationsvorschrift (Primärantikörper über Nacht [Cytokeratin bei Paraffinschnitten auch bei 2 h RT möglich]; Substrat-Inkubation 1 h bei RT). Lediglich die Primärantikörperinkubation für Vimentin erfolgt mit Mikrowellentechnik.

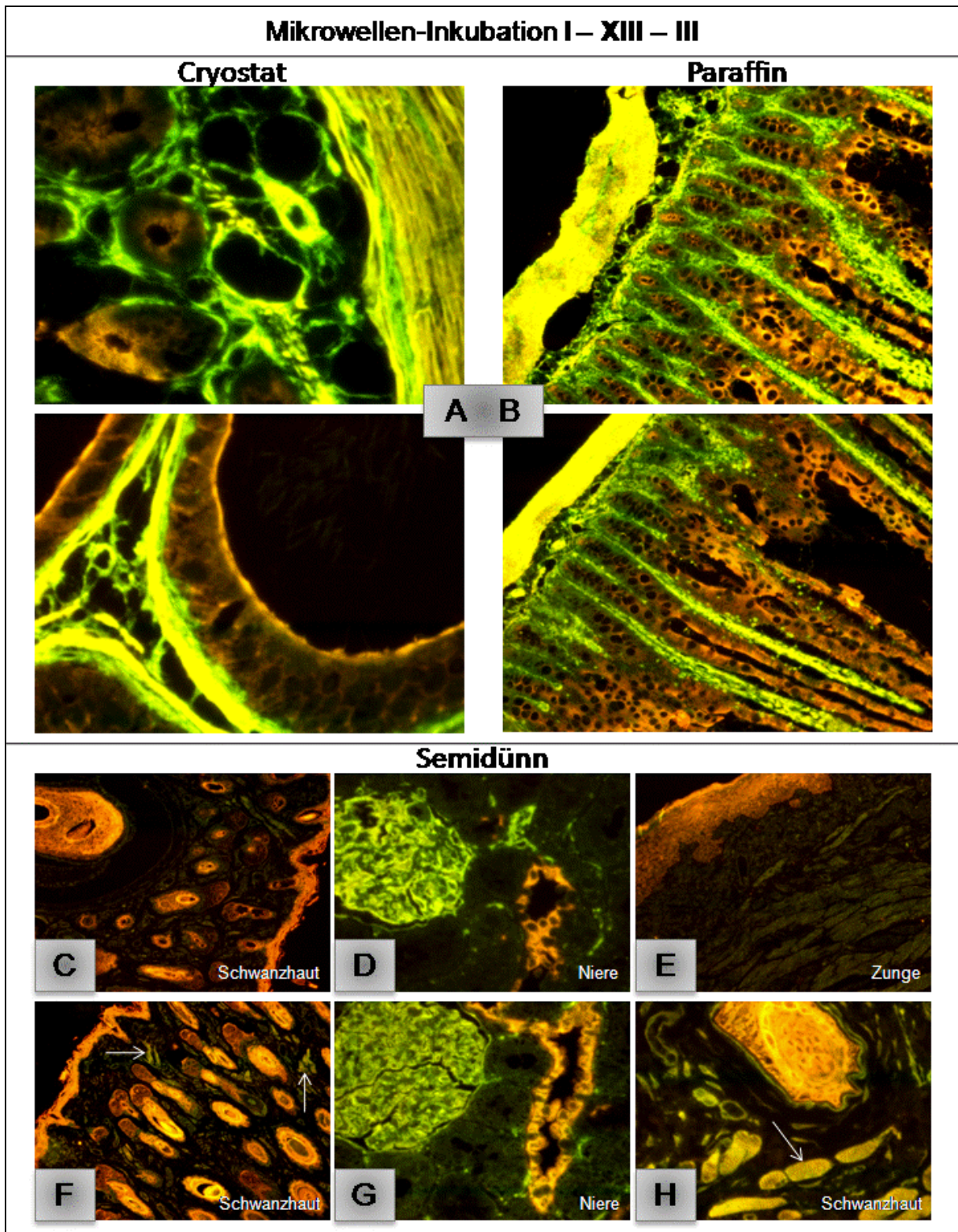
Es ist außerdem möglich den Abkühlungsprozess nach dem Autoklavieren zu verkürzen (10 min RT, 10 min 4 °C, 10 min -20 °C).

Die Mikrowellen-Inkubation führt in Cryostatschnitten nochmal zu einer Intensivierung des grün emittierenden Vimentin-Labels. Die Trichromfärbungen mit Mikrowellentechnik sind ansonsten in ihren Fluoreszenzeigenschaften und Reproduzierbarkeit vergleichbar mit Färbungen unter Standard-Inkubationsbedingungen.

Gleiches gilt für Paraffinschnitte, in denen auch die Cytokeratin-Inkubation (Primär-Ak) über Nacht als auch die Inkubation über 2 h bei RT ähnliche Ergebnisse erzielt. In Semidünnschnitten ist die Cytokeratindarstellung hervorragend. Allerdings sind die

Fluoreszenz-Intensitäten der Vimentin- und Desmindarstellung gegenüber denen in Cryostat- und Paraffinschnitten reduziert, welches zum Teil auch die Diskriminierung der unterschiedlichen Targets erschweren kann (vgl. **Abb. 6**).





**Abb. 6** Simultan-Darstellung von Vimentin (grün), Desmin (gelb) und Cytokeratin (rot) nach Mikrowellen-assistierter Inkubation (Jenalumar; Blauanregung). **A:** Cryostatschnitte von Darm und Nebenhoden. **B:** Paraffinschnitte vom Dünndarm; oben: Cytokeratin über Nacht, unten: Cytokeratin 2 h RT. Semidünnschnitte **C-H**; **C-E**: Konzentrationsverhältnis 3x-0,5x-0,5x. **F-H**: Konzentrationsverhältnis 3x-1x-1,5x. Beachte: hoch selektive und intensive grüne Darstellung Vimentin-positiver Strukturen. Bei Semidünnschnitten mit Markierungen im Konzentrationsverhältnis 3x-1x-1,5x (**F-H**) ist eine deutlich intensivere Darstellung von Muskulatur (↑) im Vergleich zum Konzentrationsverhältnis 3x-0,5x-0,5x (**C-E**) möglich.

## 7. Ergebnisse

Ausgewählte Fluorochromkombinationen und eine optimierte Inkubationsvorschrift (4.2.1.) ermöglichen die Realisierung einer simultanen Trichromfärbung mehrerer Targets (Cytofilamente Vimentin, Desmin und Cytokeratin) mittels immungebundener Peroxidase. Alle drei Farbstoffe können dabei auch mit nur einer Anregungswellenlänge simultan angeregt und sogar direkt und ohne digitales Image-Overlay im klassischen Epi-Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Von den getesteten Farbstoffen zeigten die in Tab. 3 aufgeführten Substratkombinationen gut differenzierbare Mehrfachdarstellungen in fixiertem Gewebe.

Vimentin	Desmin	Cytokeratin
I	VII	III
I	XI	III
I	XIII	III
I	XIV	III
I	XV	III
I	XVI	III
I	XVIII	III
I	XIX	III
I	XXIII	III
I	XXIV	III

**Tab. 3** Farbstoffkombinationen für die simultane Dreifachfärbung der Intermediärfilamente (Targets) Vimentin, Desmin und Cytokeratin. Für die grüne Markierung von Vimentin und die rote Markierung von Cytokeratin zeigten jeweils die Farbstoffe I und III die besten Erfolge in den Mehrfachmarkierungen. Für Desmin sind die aufgeführten gelben Fluorochrome zu verwenden. Die rot markierten Kombinationen lieferten die besten Darstellungen.

Die besten Ergebnisse erzielten die Kombinationen aus I – VII – III, I – XV – III, I – XXIV – III und I – XIII – III, wobei letztere eine herausragende Darstellung liefert. Voraussetzung für diese bestmöglichen Resultate ist die methodisch optimierte Standard-Arbeitsvorschrift unter 20 minütiger Anwendung einer Blockungslösung zwischen den Einzelsystemen, bestehend aus 10 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05 M PB als

Puffersystem. Die Primärantikörper sind in der Reihenfolge Vimentin, Desmin und als letztes Cytokeratin aufzutragen, wobei an erster Stelle (Vimentinmarkierung) das grün emittierende Fluorochrom **I** zu verwenden ist. Die Desminmarkierung erfolgt an zweiter Stelle mit einem gelb emittierenden (**VII, XI, XIII-XVI, XVIII, XIX, XXIII, XXIV**) und zuletzt wird Cytokeratin mit einem rot emittierenden Farbstoff dargestellt (**III**). Bei Cryostat- und Semidünnschnitten ist für Substrat **I** eine Konzentration von 0,15 mg in 20 ml Inkubationslösung, für den variablen gelben und das Fluorochrom **III** eine Konzentration von 0,025 mg Substrat in 20 ml Inkubationslösung zu bevorzugen. Abweichend davon sind bei Paraffinschnitten der gelbe Farbstoff in einer Konzentration von 0,05 mg und der rote Farbstoff (**III**) von 0,075 mg in oben genannter Inkubationslösung zu verwenden.

Die simultane Trichromfärbung mit der Farbstoffkombination **I – VII – III** zeigt eine hervorragend voneinander abgrenzbare Darstellung der genannten drei Cytofilamente (**Abb. 7**). Die Markierung ist in verschiedenen Organen gut reproduzierbar, der Background dabei ausgesprochen niedrig. Hohe Sensitivität, Spezifität und Intensität der Farbgebung ermöglichen eine sehr gute Differenzierung von Gewebestrukturen. Lediglich bei sehr starker Muskulatur ist eine leichte Überlagerung des markierten Desmins mit dem rot emittierenden Farbstoff **III** zu beobachten.

Die Dreifachmarkierung mit der Farbstoffkombination **I – XIII – III** (**Abb. 8**) zeigt ähnliche Eigenschaften wie die zuvor beschriebene. Sie kennzeichnet sich durch die hoch selektive Markierung und die hervorragende Intensität des rot emittierenden Farbstoffs **III** und des grünen Farbstoffs **I**. Diese Eigenschaften ermöglichen ebenfalls hervorragende Darstellungen bei enorm geringem Background und außerordentlicher Spezifität. Die Markierung ist in unterschiedlichen Organen und Geweben reproduzierbar.

Die Kombination der Fluorochrome **I – XIV – III** (**Abb. 9 A + B**) liefert eine gute Dreifachfärbung, wobei die Intensität des gelben (**XIV**) und des roten (**III**) Farbstoffes an die Qualität der oben genannten Markierungen nicht ganz heran reicht. Desweiteren findet sich eine stärkere Überlagerung der Desmindarstellung durch Fluorochrom **III** und auch die Vimentin-Zeichnung erscheint nicht so selektiv.

Hervorragende Darstellungen liefert die Farbstoffkombination **I – XV – III** (**Abb. 9 C + D**). Auffallend ist die intensiv gelbe Emission des Fluorochroms **XV**. Bei dieser

Kombination scheinen die Farbstoffe den geringsten cross-talk aufzuweisen, so dass vor allem weniger Überlagerung durch den rot emittierenden Farbstoff **III** erfolgt. Eine sehr gute Differenzierung wird durch die hohe Selektivität der einzelnen Fluorochrome möglich, wobei die Intensität nicht ganz an die Färbungen **I – VII – III** und **I – XIII – III** heran reicht.

Das Fluorochrom **XVI** zeigt in der Multichromfärbung (**Abb. 10 A + B**) nicht so intensive Darstellungen und wird auch vermehrt vom Fluorochrom **III** überlagert. Insgesamt fehlt aber auch den anderen beiden Farbstoffen hier die herausragende Intensität, trotzdem ist eine gute Dreifachfärbung und Abgrenzung der einzelnen Targets möglich.

In der Färbung **I – XIX – III** fällt auch die nicht so feine Zeichnung des grün markierten Vimentins auf (**Abb. 10 C + D**). Es werden ähnlich gute Ergebnisse erzielt wie bei der vorher genannten Kombination, allerdings ist die Überlagerung durch den bathochromen Farbstoff **III** noch ausgeprägter.

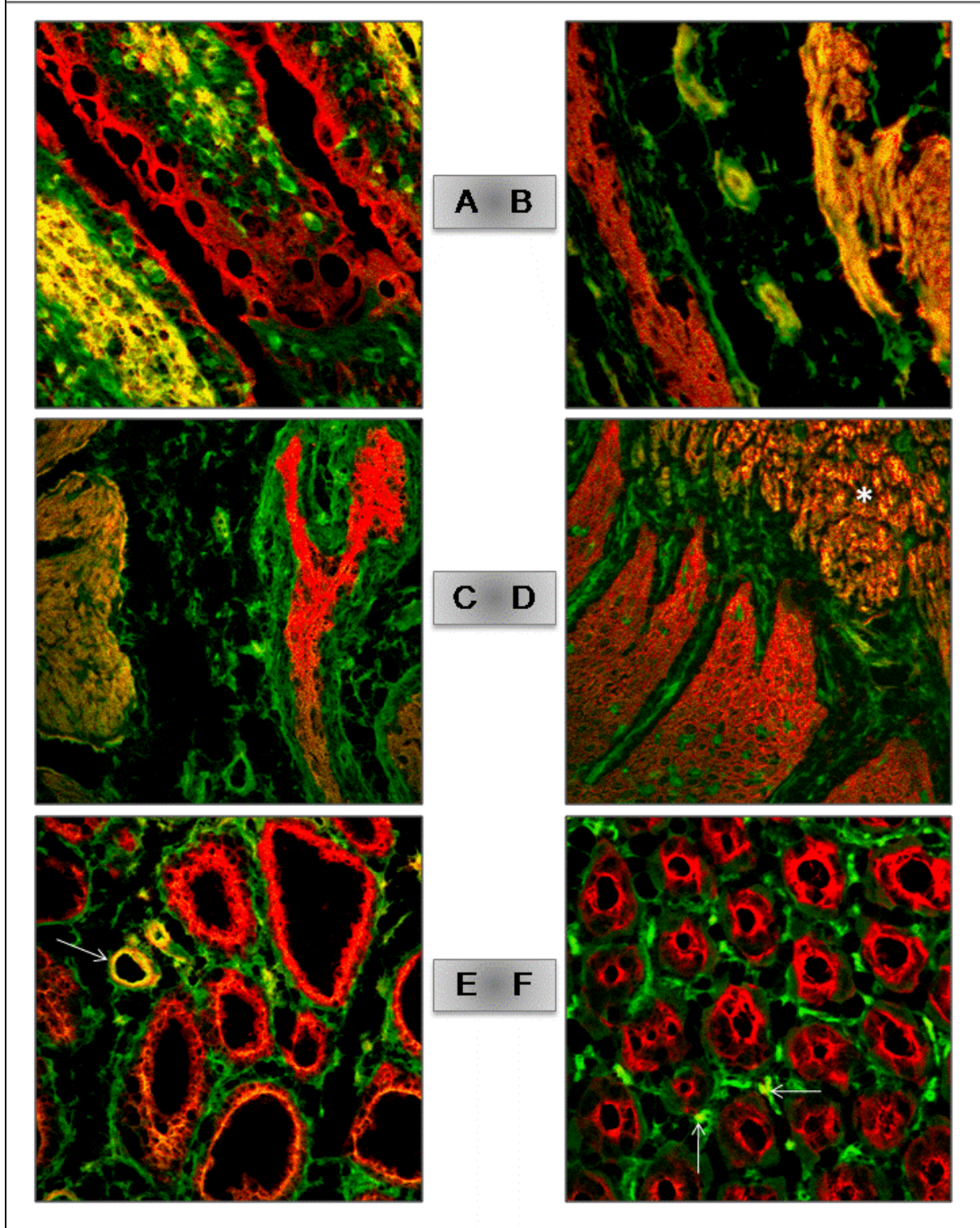
Die simultane Kombination **I – XXIII – III** zeigt eine sehr gute Differenzierungsmöglichkeit mit nur geringer Überlagerung des Desmins (**Abb. 11**). Lediglich die Intensität des roten Fluorochroms **III** ist gelegentlich nicht so durchschlagend.

Die hohe individuelle Selektivität der einzelnen Farbstoffe, ihre gleichzeitige Anregbarkeit und die visuelle Separierbarkeit der Fluoreszenzemission ermöglicht die Trichromfärbung **I – XXIV – III** (**Abb. 12**) mit hervorragender simultaner Darstellung der Targets. Lediglich hinsichtlich der Intensität (v.a. Fluorochrom **III**) ist diese Markierung ein wenig schwächer einzuordnen als **I – VII – III** und **I – XIII – III**.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Kombinationen (laut **Tab. 3**) sehr gut differenzierbare Dreifachfärbungen ermöglichen, wobei sich Unterschiede vor allem in der Intensität der Cytokeratin- und/oder Desminmarkierung zeigen und sich auch weniger oder stärkere Überlagerungen des Desmins durch das rot emittierende Fluorochrom **III** ergeben (beste Simultandarstellungen: **I – VII – III**, **I – XV – III**, **I – XXIV – III** und **I – XIII – III**). Die Vor- und Nachteile letzteren Effektes werden in der Diskussion erläutert.

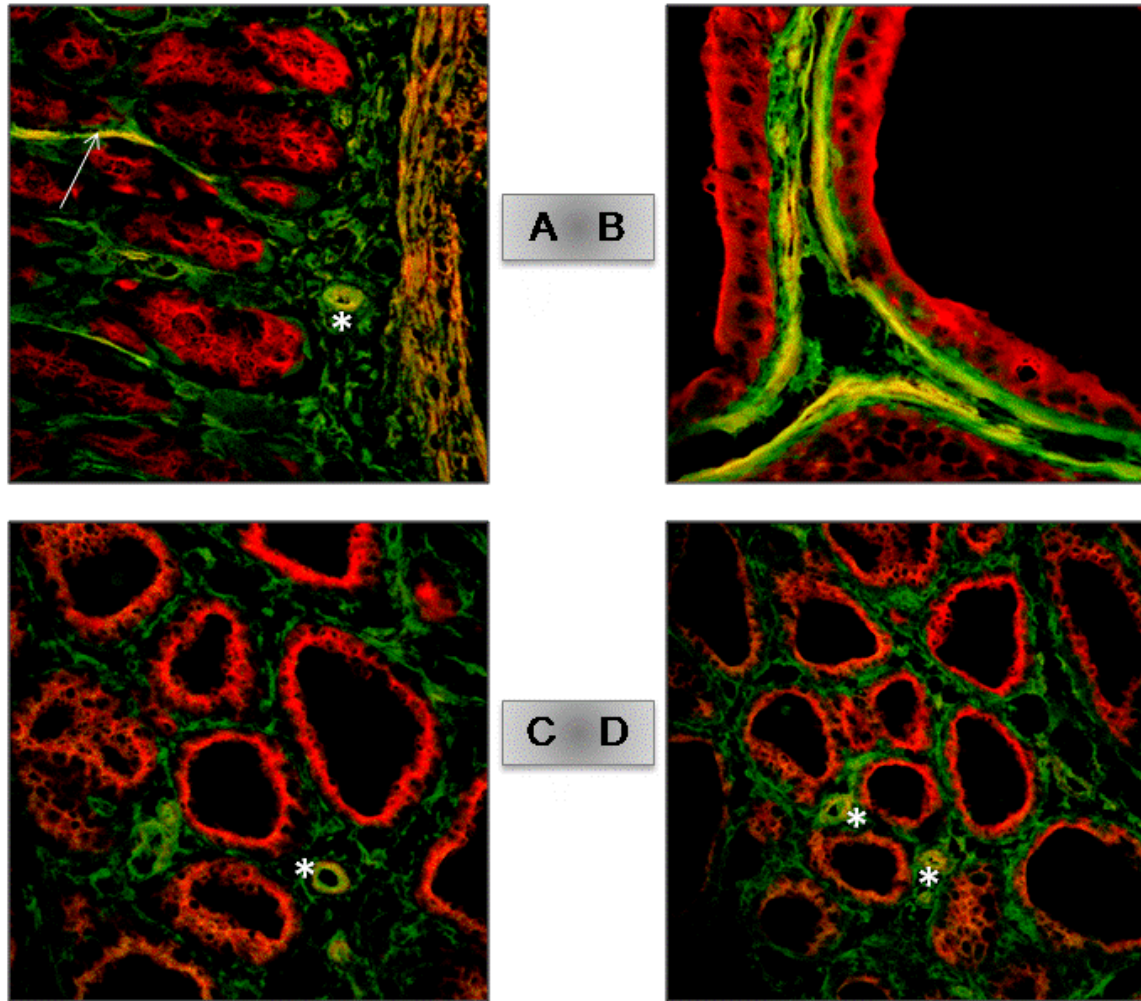


## Simultane Trichromfärbung I – VII – III



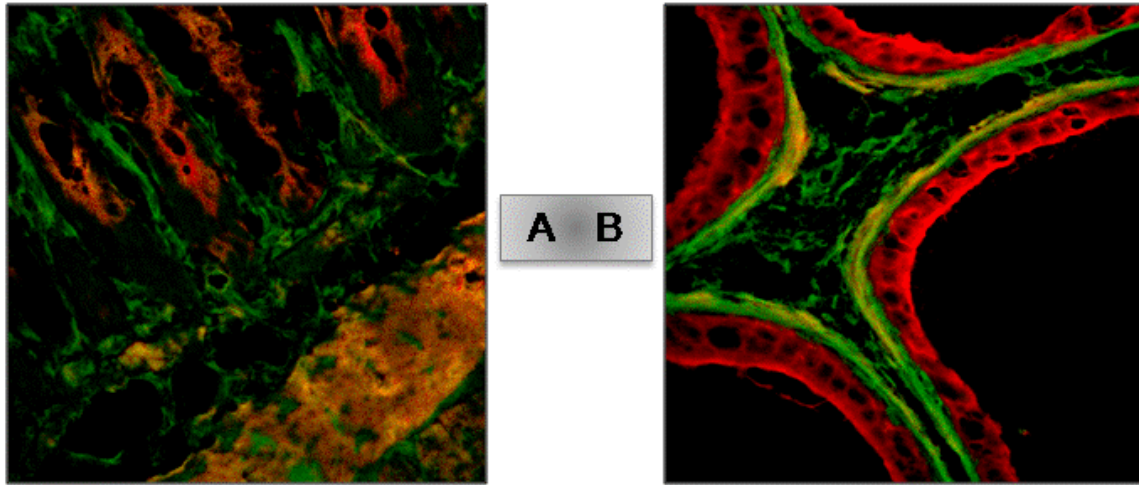
**Abb. 7** Simultan-Darstellung von Vimentin (I – grün), Desmin (VII – gelb) und Cytokeratin (III – rot) in Cryostatschnitten (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ , falschfarbenkodiert). **A:** Dünndarmschleimhaut. **B, C:** Harnblase. **D:** Zunge. **E:** Schilddrüse. **F:** Magenschleimhaut. Beachte: hoch selektive und intensive Trichrommarkierung – auch kleinste Gefäße darstellbar ( $\uparrow$ ). Lediglich geringe Überlagerung durch Farbstoff III bei starker Muskulatur (\*).

## Simultane Trichromfärbung I – XIII – III

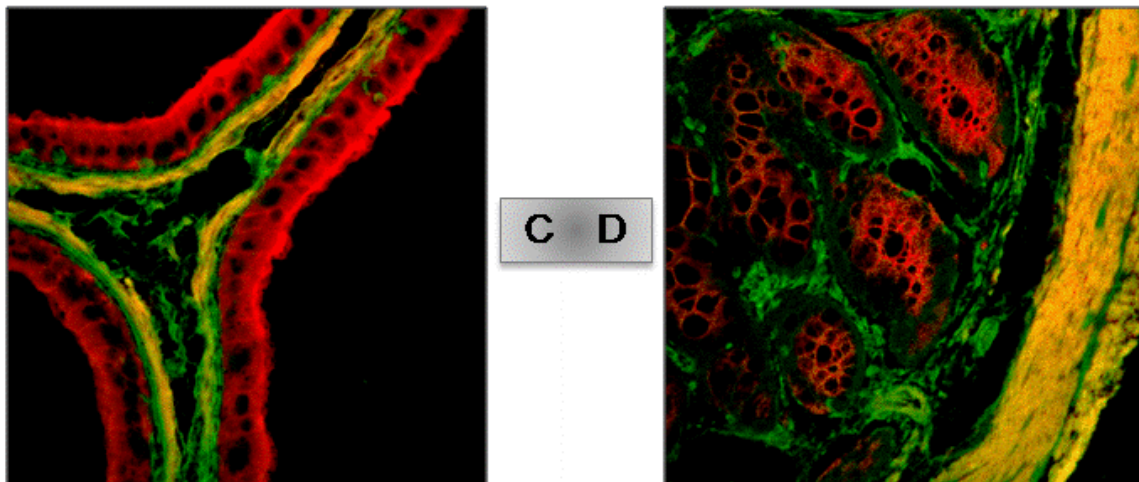


**Abb. 8** Simultan-Darstellung von Vimentin (I – grün), Desmin (XIII – gelb) und Cytokeratin (III – rot) in Cryostatschnitten (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ , falschfarbenkodiert). **A:** Dünndarm. **B:** Nebenhoden. **C, D:** Schilddrüse. Beachte: hoch selektive und intensive Trichrommarkierung – auch zarte Lamina muscularis mucosae ( $\uparrow$ ) und kleinste Gefäße sehr gut darstellbar (\*).

### Simultane Trichromfärbung I – XIV – III



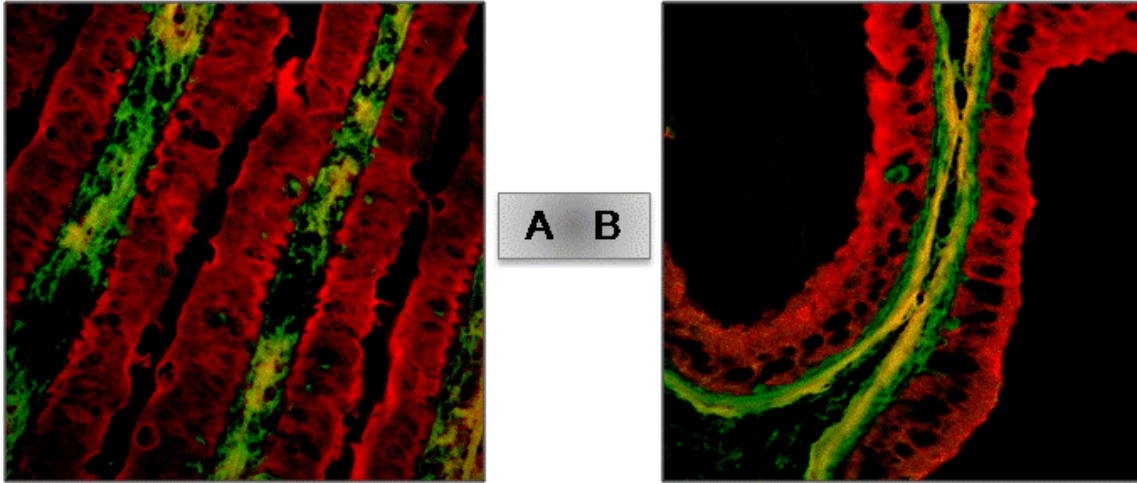
### Simultane Trichromfärbung I – XV – III



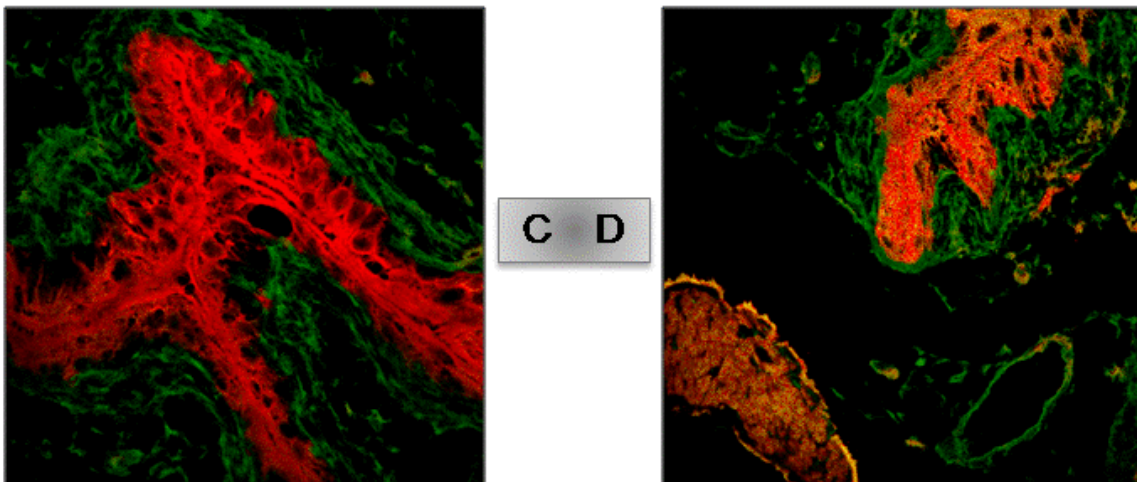
**Abb. 9** Simultan-Darstellung von Vimentin (I – grün), Desmin (XIV → A+B und XV → C+D – gelb) und Cytokeratin (III – rot) in Cryostatschnitten (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ , falschfarbenkodiert). **A+D:** Dünndarm. **B+C:** Nebenhoden. Beachte: Kombination I – XIV – III v.a. Fluorochrom III nicht so intensiv und vermehrte Überlagerung des gelb-markierten Desmins. Kombination I – XV – III ausgesprochen selektive und intensive Darstellung.



### Simultane Trichromfärbung I – XVI – III



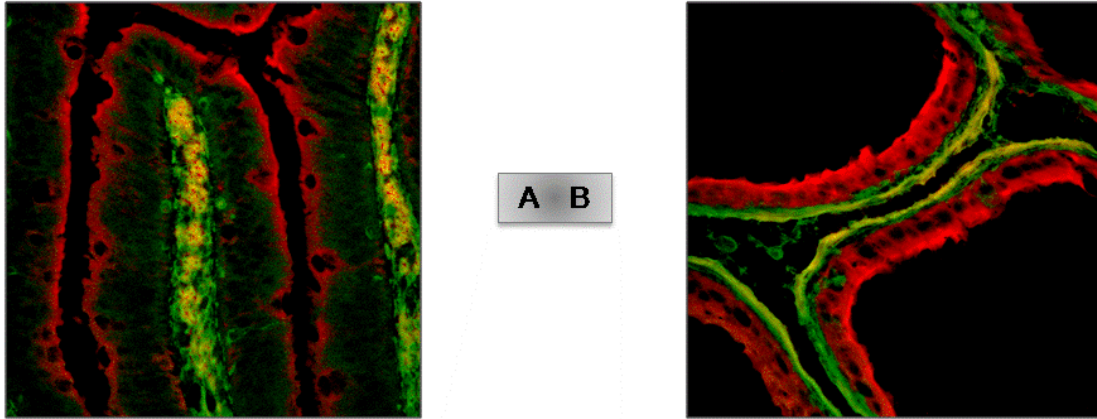
### Simultane Trichromfärbung I – XIX – III



**Abb. 10** Simultan-Darstellung von Vimentin (I – grün), Desmin (XVI → A+B und XIX → C+D – gelb) und Cytokeratin (III – rot) in Cryostatschnitten (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}}$  = 488 nm, falschfarbenkodiert). **A:** Dünndarmzotten. **B:** Nebenhoden. **C, D:** Harnblase. *Beachte:* Bei der Kombination I – XVI – III fehlt insgesamt die herausragende Intensität, trotzdem gute Differenzierung möglich. Kombination I – XIX – III ausgeprägte Überlagerung mit Fluorochrom III.

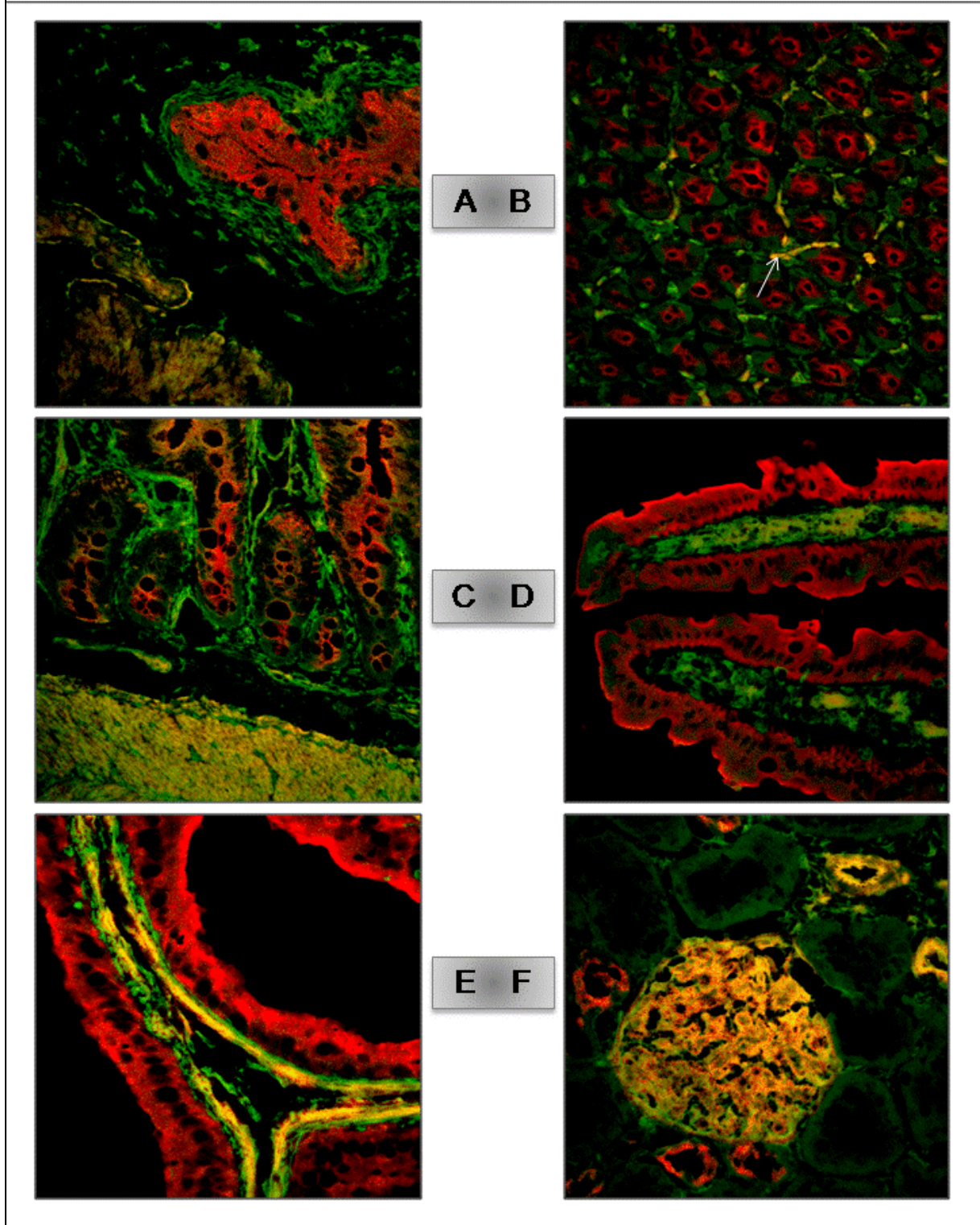


### Simultane Trichromfärbung I – XXIII – III



**Abb. 11** Simultan-Darstellung von Vimentin (I – grün), Desmin (XXIII – gelb) und Cytokeratin (III – rot) in Cryostatschnitten (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ , falschfarbenkodiert). **A:** Dünndarmzotten. **B:** Nebenhoden. Beachte: Insgesamt gute Differenzierungsmöglichkeit der einzelnen Targets bei gelegentlich nicht so durchschlagender Intensität des rot emittierenden Fluorochroms.

## Simultane Trichromfärbung I – XXIV – III



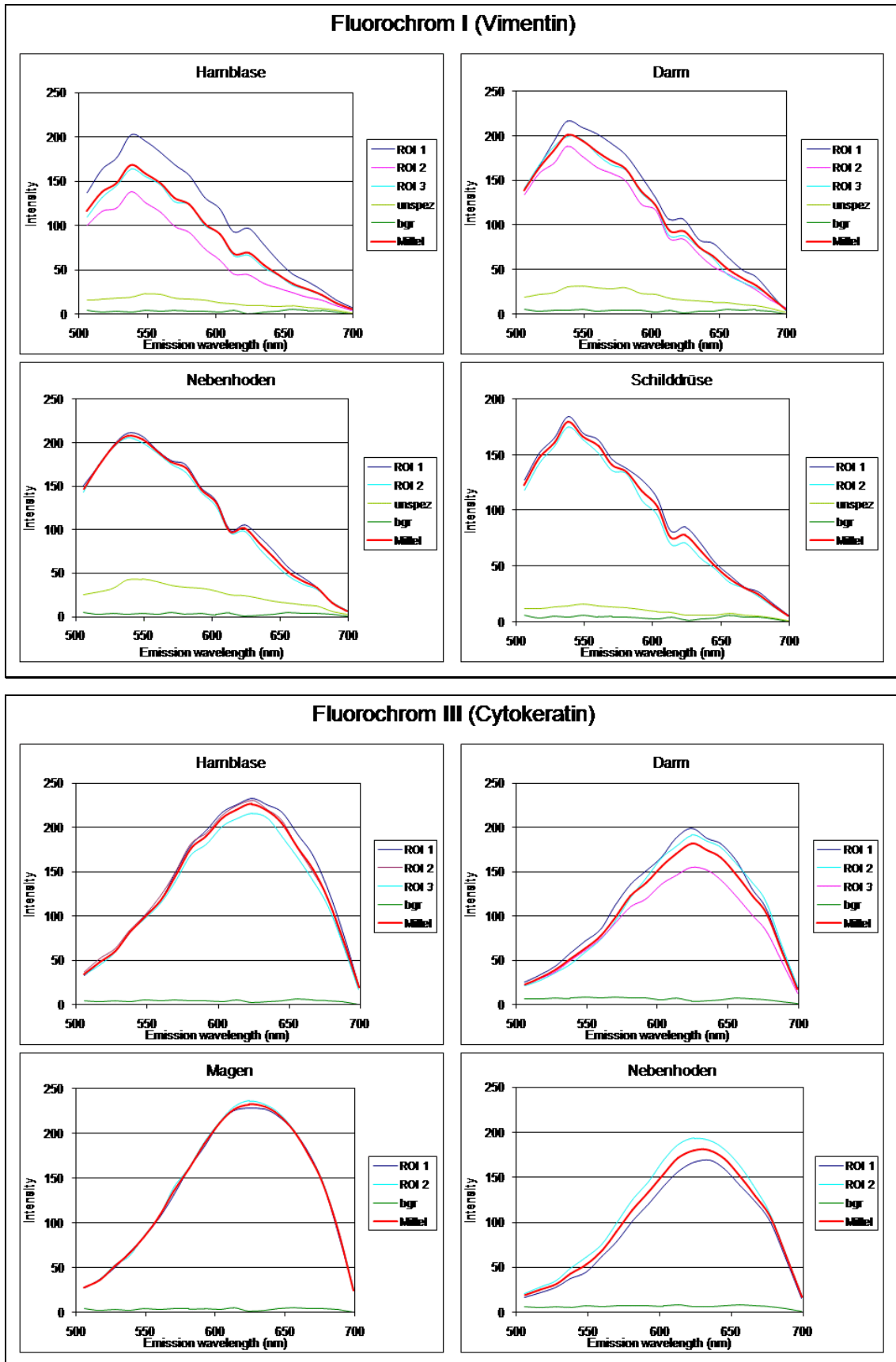
**Abb. 12** Simultan-Darstellung von Vimentin (I – grün), Desmin (XXIV – gelb) und Cytokeratin (III – rot) in Cryostatschnitten (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ , falschfarbenkodiert). **A:** Harnblase. **B:** Magenschleimhaut. **C:** Dünndarm. **D:** Dünndarmzotten. **E:** Nebenhoden **F:** Niere. Beachte: hervorragende simultane Darstellung und Differenzierbarkeit der einzelnen Targets – auch kleinste Gefäße darstellbar ( $\uparrow$ ).

Von ausgewählten Fluorochromen und Trichromfärbungen, welche sich in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie bewährten, wurden  $\lambda$ -Scans mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops der Firma Zeiss (LSM 510 META) durchgeführt. Verwendet wurden Cryostatschnitt-Sammelobjektträger zur Beurteilung der spektralen Eigenschaften in verschiedenen Organen.

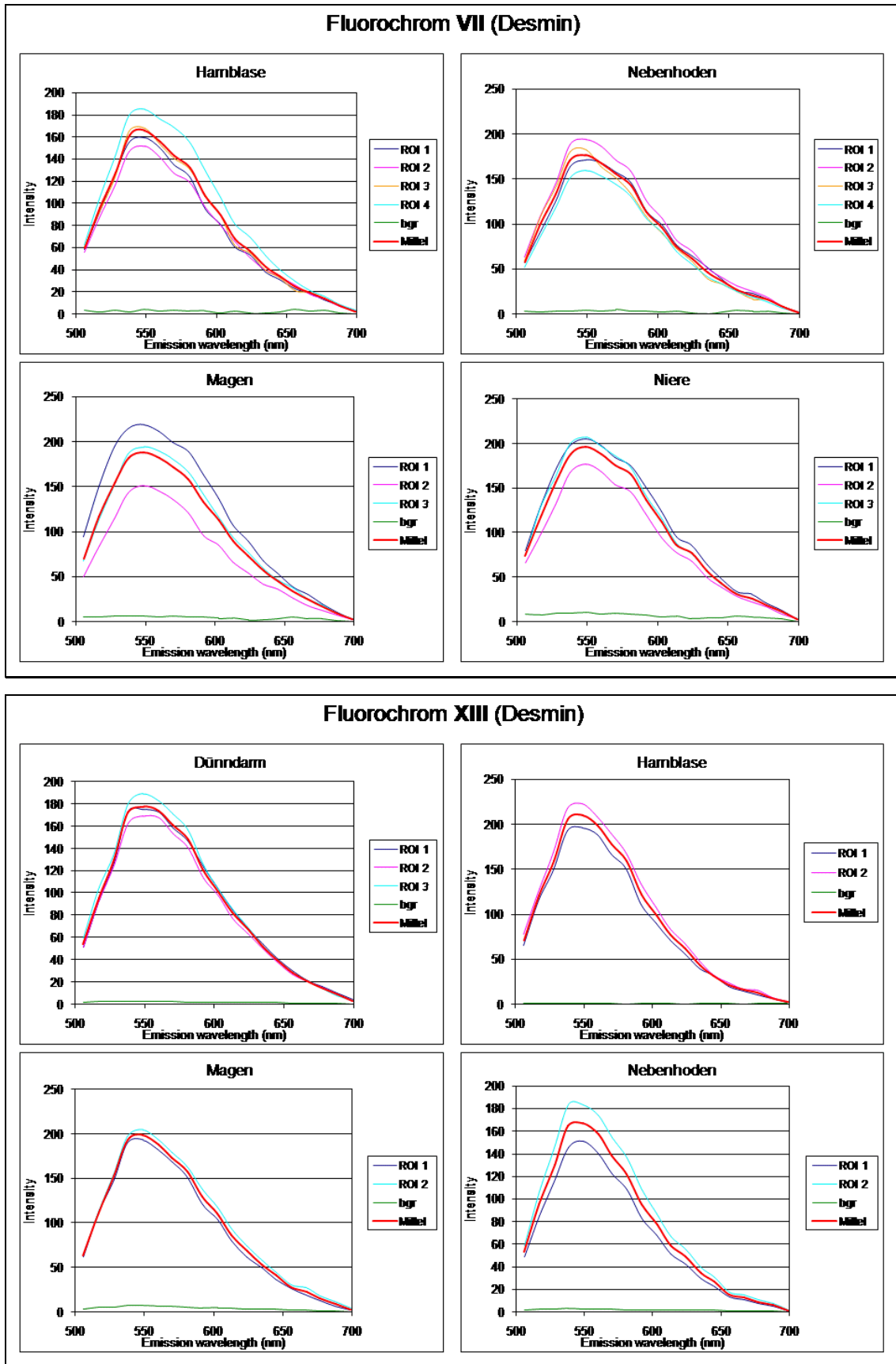
### Eigenschaften einzelner Fluorochrome

Die Substrate **I**; **III**; **VII**; **XI**; **XIII**; **XIV**; **XV**; **XVI**; **XVIII**; **XIX**; **XXIII**; **XXIV** wurden separat in Monochromfärbungen (Cryostatschnitte) hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften innerhalb eines Organs untersucht. Dazu wurden innerhalb eines Organs mehrere ROIs (region of interest) festgelegt und gleichzeitig der Background analysiert. Desweiteren erfolgte ein Vergleich der Emissionsspektren jedes einzelnen Fluorochromes in verschiedenen Organen.

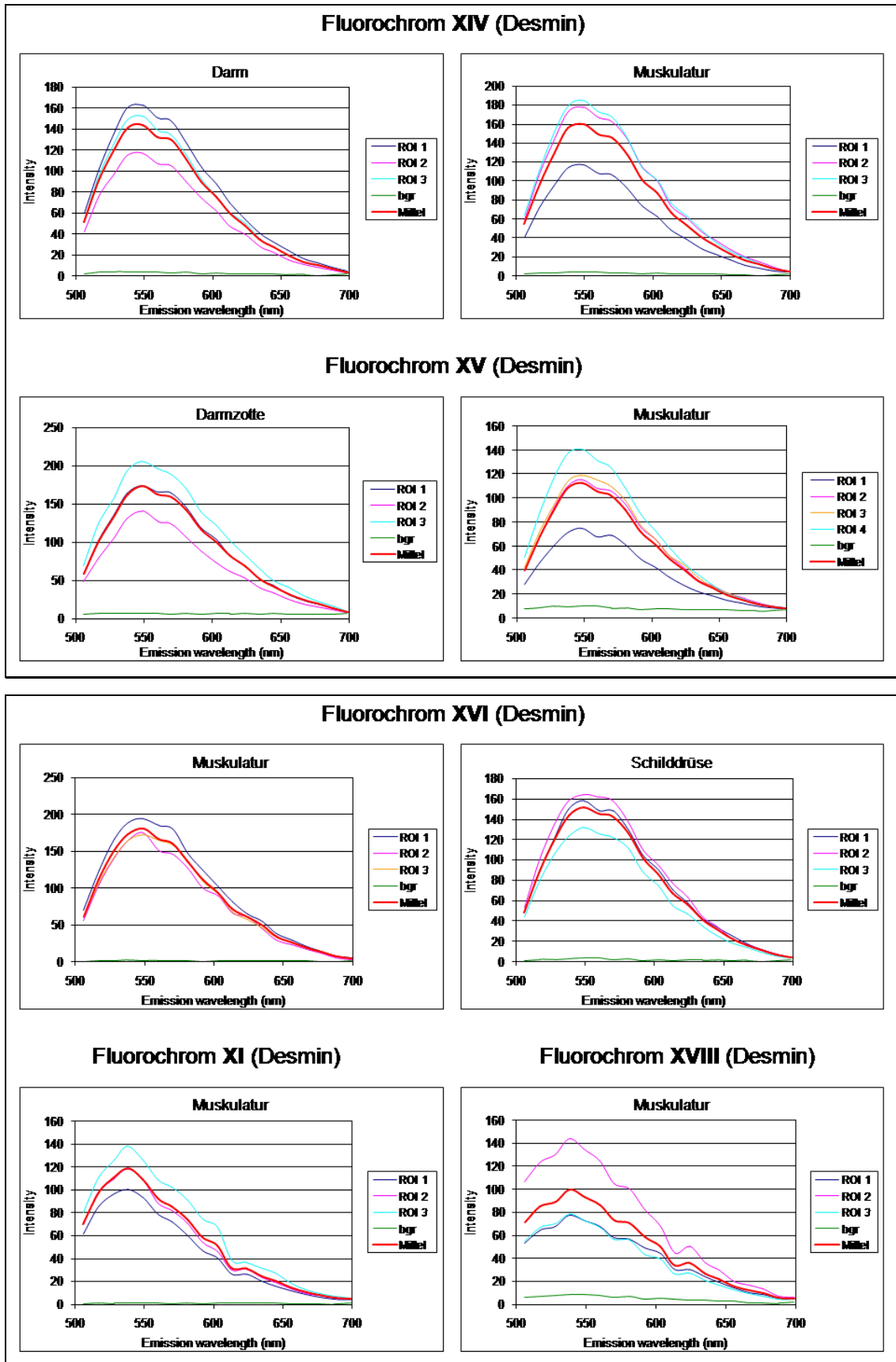
Das grün emittierende Fluorochrom **I** hat sein Emissionsmaximum bei ca. 538 nm und ein weiteres bei ca. 624 nm. Sowohl innerhalb der einzelnen Organe als auch zwischen den Targets zeigen sich zwar Intensitätsunterschiede der Emission, aber keine spektralen Verschiebungen. Der durch endogene Fluorochrome als auch der jeweils Farbstoff-induzierte (Auftreten vom Emissionsmaxima) Background ist minimal, lediglich im Epithel lassen sich geringfügige Unspezifitäten finden (**Abb. 13; oben**). Der „bathochrome“ Farbstoff **III** liegt mit seinem Emissionsmaximum im Roten (624-635 nm). Seine spektralen Eigenschaften sind identisch innerhalb eines und auch in verschiedenen Organen. Auch hier zeigt sich ein äußerst geringer Background (**Abb. 13; unten**). Die Emissionsmaxima der Fluorochrome **VII**, **XIII**, **XIV**, **XV**, **XVI**, **XXIII** und **XXIV** liegen alle bei ca. 549 nm und damit im gelb-grün emittierenden Bereich. Die Substrate **VII**, **XIII** und **XXIV** (**Abb.14** und **Abb. 16; unten**) zeigen noch ein zweites Maximum bei ca. 580 nm (gelb) und die Fluorochrome **XIV**, **XV**, **XVI** und **XXIII** (**Abb. 15** und **Abb. 16; unten**) ein zweites Emissionsmaximum bei ca. 570 nm. Die Farbstoffe **XI**, **XVIII** und **XIX** (**Abb. 15; unten** und **Abb. 16; oben**) haben ihre Emissionsmaxima bei ca. 538 nm (gelb)grün und die beiden letzteren besitzen noch ein weiteres bei ca. 624 nm (orange). Wie schon bei den vorher genannten Farbstoffen zeigen sich keine Unterschiede in der spektralen Verteilung bei minimalem Background.



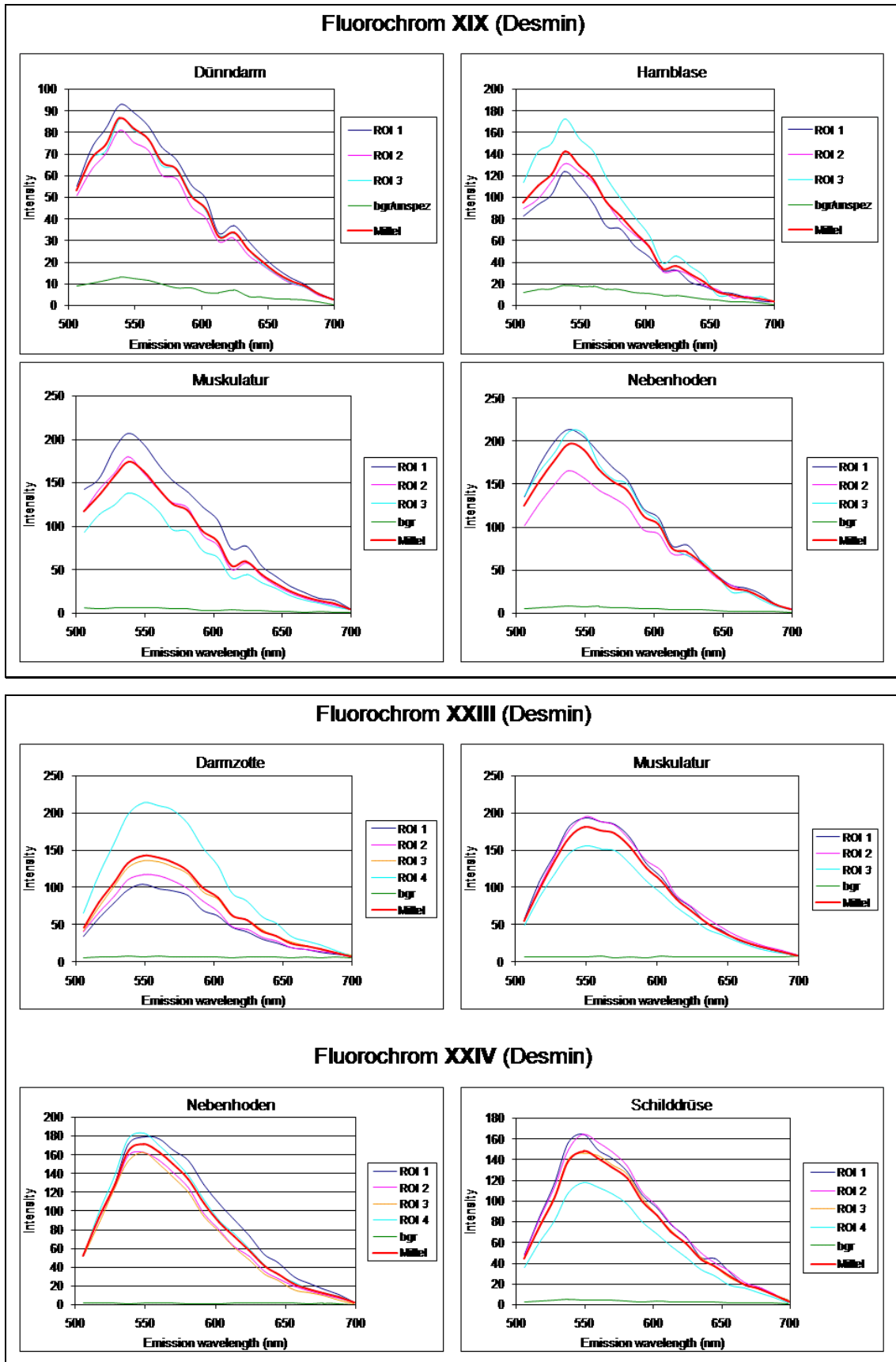
**Abb. 13** Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzemission in verschiedenen Organen (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ). oben: Fluorochrom I, Vimentin-Monochromfärbung; unten: Fluorochrom III, Cytokeratin-Monochromfärbung



**Abb. 14** Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzemission in verschiedenen Organen (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ). oben: Fluorochrom **VII**, Desmin-Monochromfärbung; unten: Fluorochrom **XIII**, Desmin-Monochromfärbung



**Abb. 15** Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzemission in verschiedenen Organen (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ). oben: Fluorochrom **XIV** und **XV**, Desmin-Monochromfärbung; unten: Fluorochrom **XVI**, **XI** und **XVIII**, Desmin-Monochromfärbung



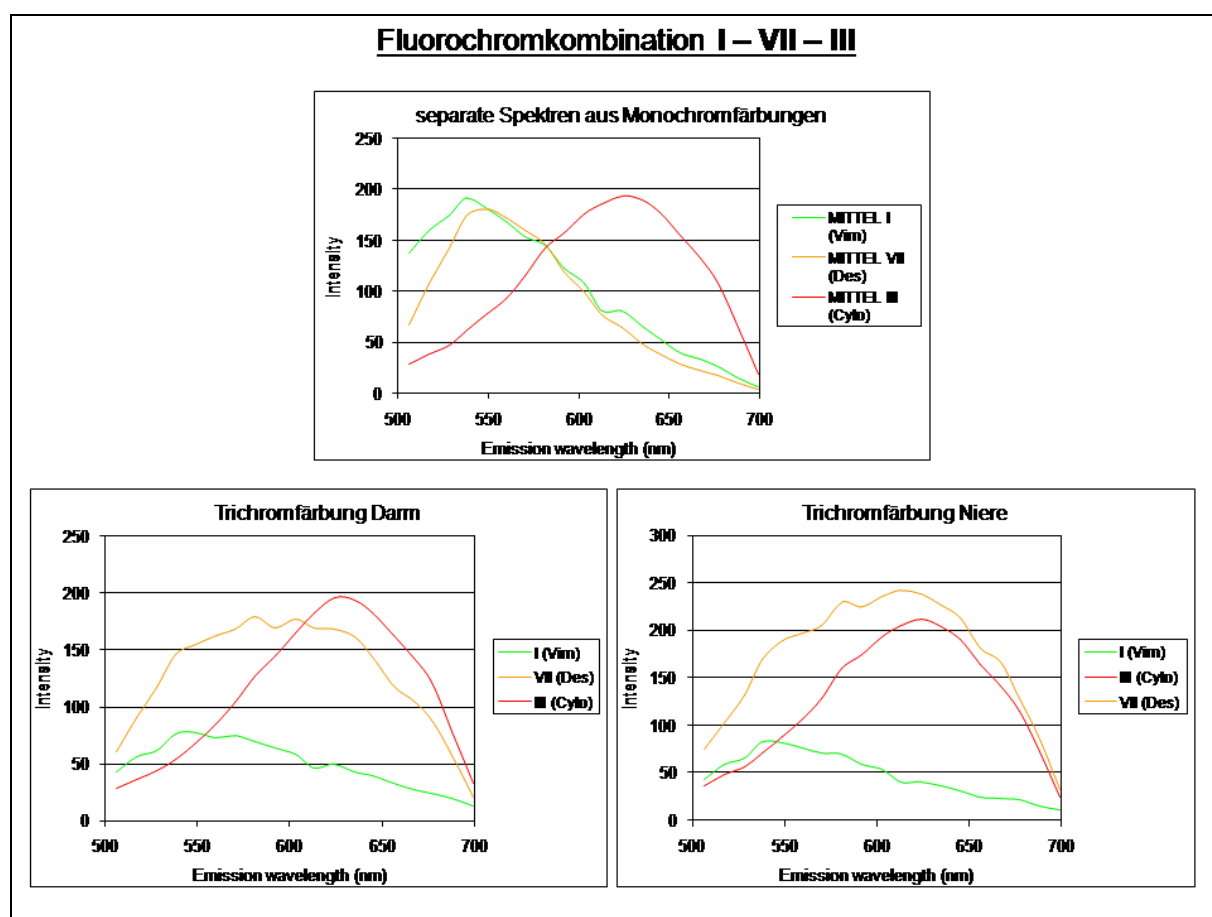
**Abb. 16** Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzemission in verschiedenen Organen (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ). oben: Fluorochrom **XIX**, Desmin-Monochromfärbung; unten: Fluorochrom **XXIII** und **XXIV**, Desmin-Monochromfärbung



Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle untersuchten Fluorochrome eine hohe intra- und interorganische Spezifität mit geringem Background besitzen und dass die spektralen Eigenschaften innerhalb eines und zwischen den verschiedenen Organen identisch sind.

### Eigenschaften ausgewählter Trichromfärbungen

Bei der Fluorochromkombination **I – VII – III** (**Abb. 17**) zeigen sich keine Unterschiede in den spektralen Eigenschaften des grün- (**I**) und rot- emittierenden (**III**) Farbstoffes zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen (arithmetisches Mittel der Einzelemissionen, s.o.). Beide Substrate zeigen jeweils identische Emissionsmaxima in den durchgeführten  $\lambda$ -Scans. Das gelb emittierende Fluorochrom (**VII**) zeigt in den Dreifachfärbungen ein

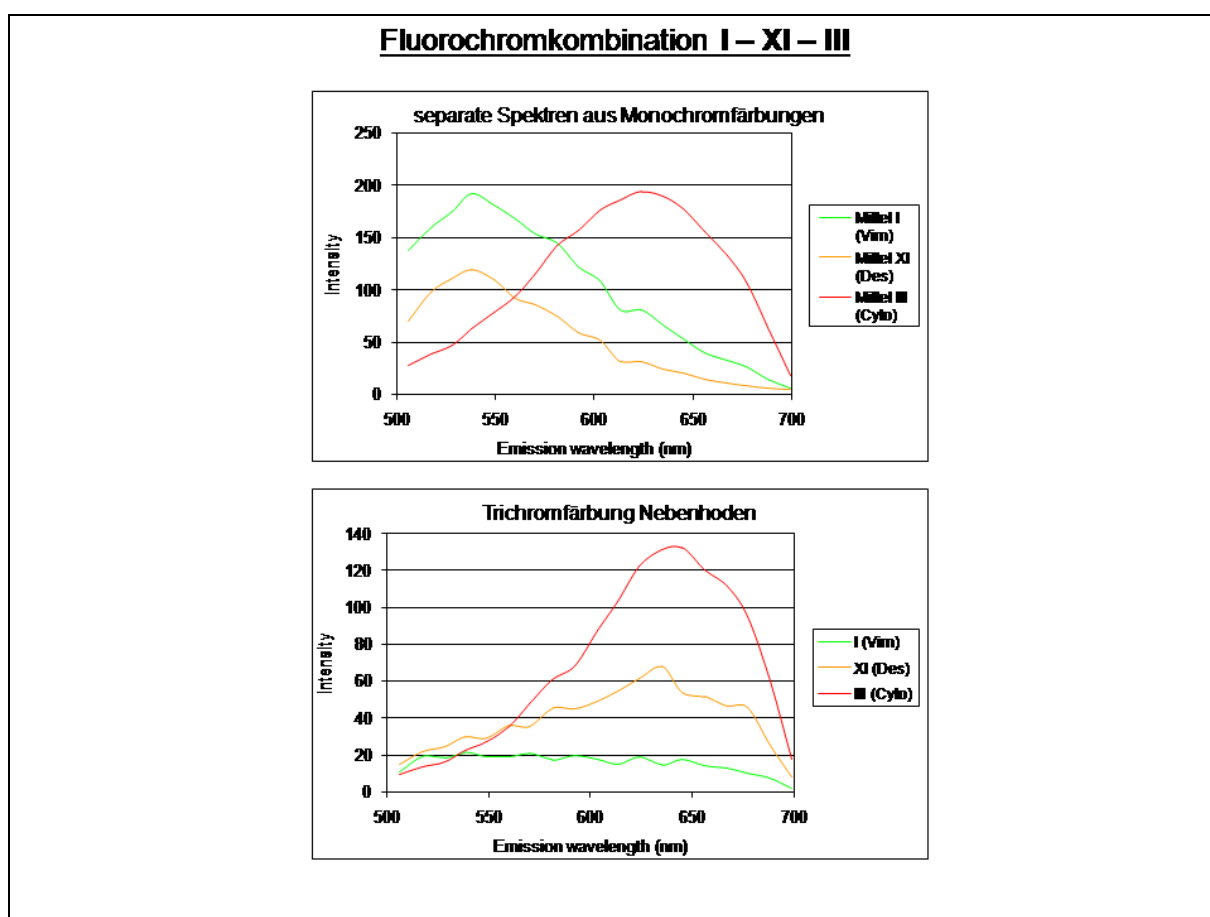


**Abb. 17** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **VII** und **III** in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).



Emissionsmaximum bei 581 nm und einen weiteren Peak im Bereich des Emissionsmaximums von Fluorochrom **III**. Es erfolgt also eine spektrale Verschiebung der Emission (bathochromer shift) des Farbstoffes **VII** um ca. 32 nm bei gleichzeitiger Überlagerung mit dem rot emittierenden Farbstoff. Die Intensität und die Spezifität der einzelnen Farbstoffe in den Trichromfärbungen sind hervorragend, mit der Ausnahme der dezenten Überlagerung des Desmins durch den Farbstoff **III**. Diese Eigenschaften der genannten Farbstoffkombination sind in verschiedenen Organen reproduzierbar.

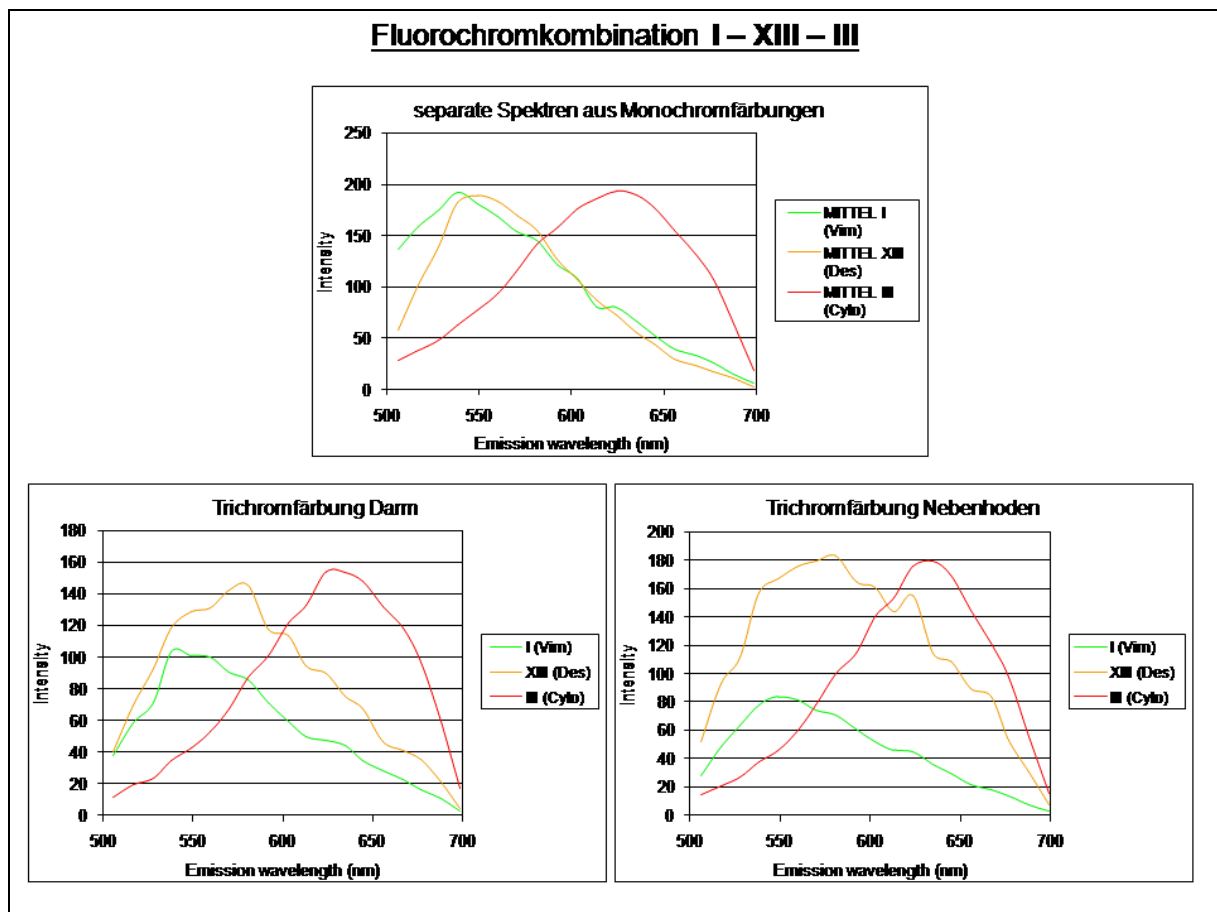
Die Trichromfärbung mit den Substraten **I**, **XI** und **III** zeigt ebenfalls identische spektrale Eigenschaften für den grün (**I**) und rot emittierenden (**III**) Farbstoff wie in den Einzelfärbungen (**Abb. 18**). Das gelb emittierende Fluorochrom (**XI**) weist in der Dreifachfärbung eine deutliche Überlagerung durch den Farbstoff **III** mit kleinem



**Abb. 18** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XI** und **III** in Monochromfärbungen und simultaner Trichromfärbung (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

Maximum bei 581 nm auf. Damit kommt es bei diesem Fluorochrom zu einer spektralen Verschiebung der Emission (bathochromer shift) um ca. 43 nm bei gleichzeitiger Überlagerung mit dem rot emittierenden Farbstoff.

Die Dreifachmarkierung **I – XIII – III** (**Abb. 19**) hat ähnliche Eigenschaften wie die oben beschriebene Kombination der Farbstoffe **I – VII – III**. Die spektralen Eigenschaften des grün (I) und rot emittierenden (III) Farbstoffes sind zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen wieder identisch. Das Fluorochrom **XIII** (gelb) zeigt ein Emissionsmaximum bei 581 nm (bathochromer shift um 32 nm gegenüber der Monochromfärbung) und nur einen geringen Peak im Bereich von 624 nm, welcher auf unspezifische Überlagerung durch den rot emittierenden Farbstoff **III** zurückzuführen ist. Diese spektralen Eigenschaften lassen sich in mehreren Organen nachweisen und die Intensität, sowie die Spezifität der

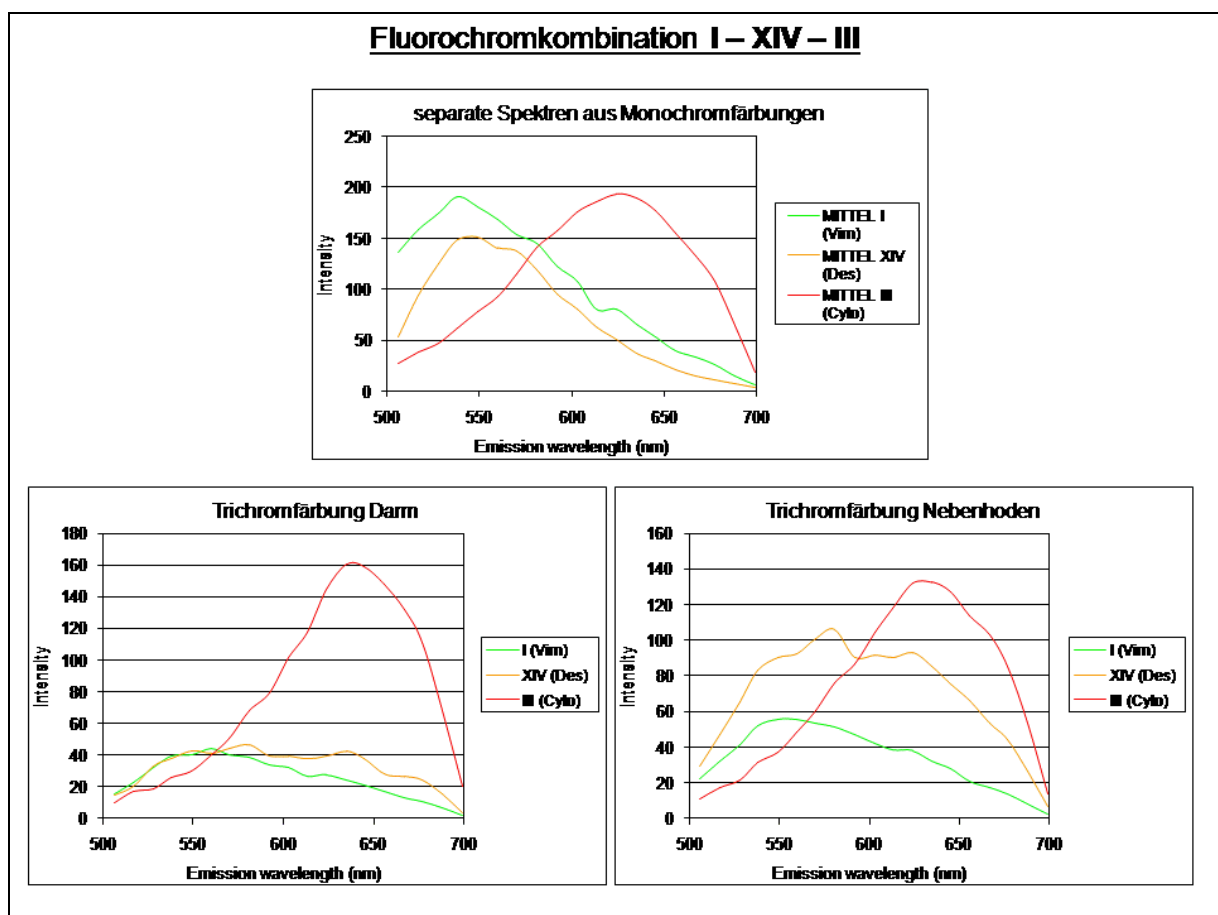


**Abb. 19** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XIII** und **III** in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

einzelnen Farbstoffe in der Trichromfärbungen ist hervorragend.

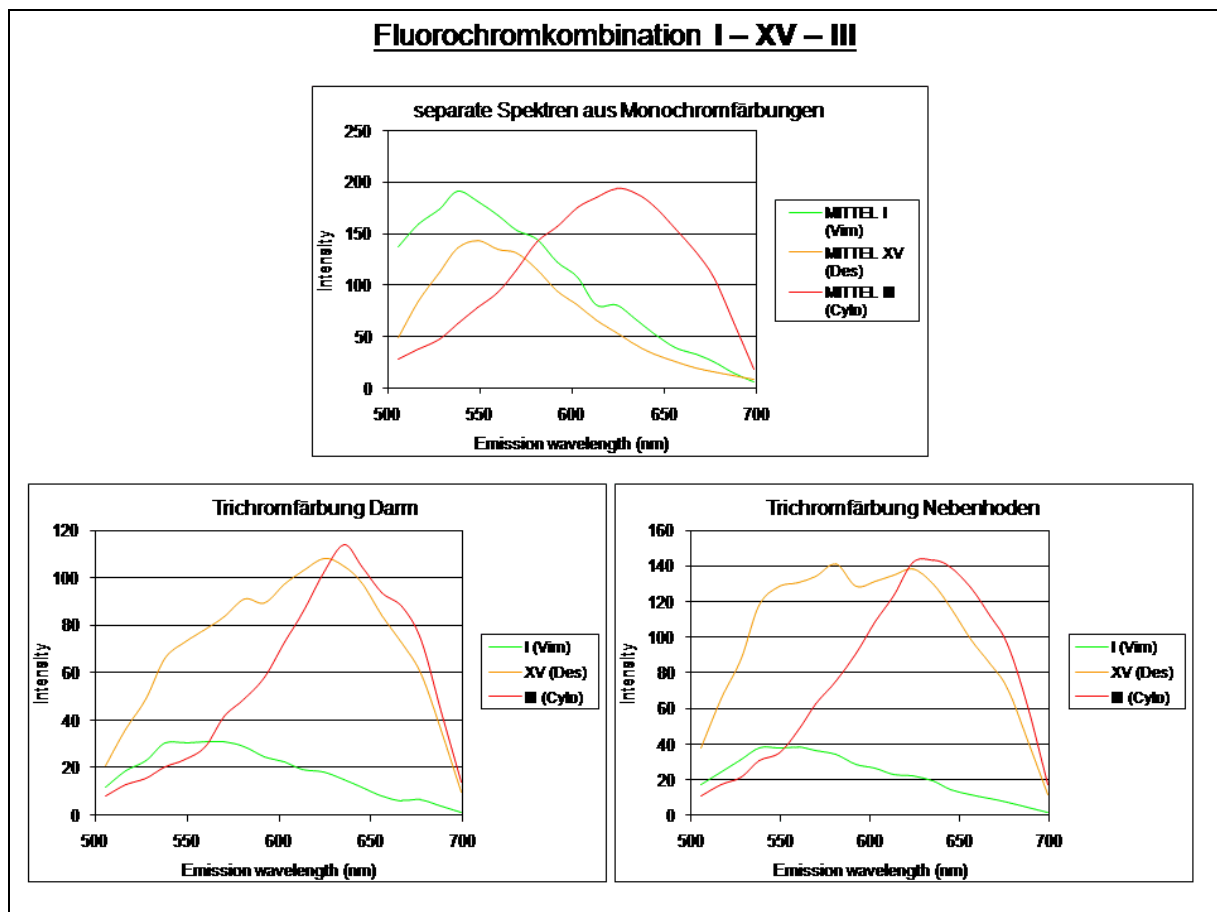
Bei der Fluorochromkombination **I – XIV – III** zeigen sich ebenfalls keine Unterschiede in den spektralen Eigenschaften des grün (**I**) und rot emittierenden (**III**) Farbstoffes zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen (**Abb. 20**). Beide Substrate zeigen jeweils übereinstimmende Emissionsmaxima in den durchgeführten  $\lambda$ -Scans. Das Emissionsmaximum des gelb markierten Desmins (Fluorochrom **XIV**) verschiebt sich um 32 nm auf 581 nm gegenüber den ermittelten Eigenschaften aus der Einzelmessung. Die spektralen Eigenschaften ähneln sich in den untersuchten Organen. Wiederum lässt sich eine milde Überlagerung durch den Farbstoff **III** nachweisen.

Die Trichromfärbung **I – XV – III** (**Abb. 21**) besitzt ähnliche Eigenschaften wie die oben beschriebenen Kombinationen der Farbstoffe **I – VII – III** und **I – XIII – III**. Die



**Abb. 20** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XIV** und **III** in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

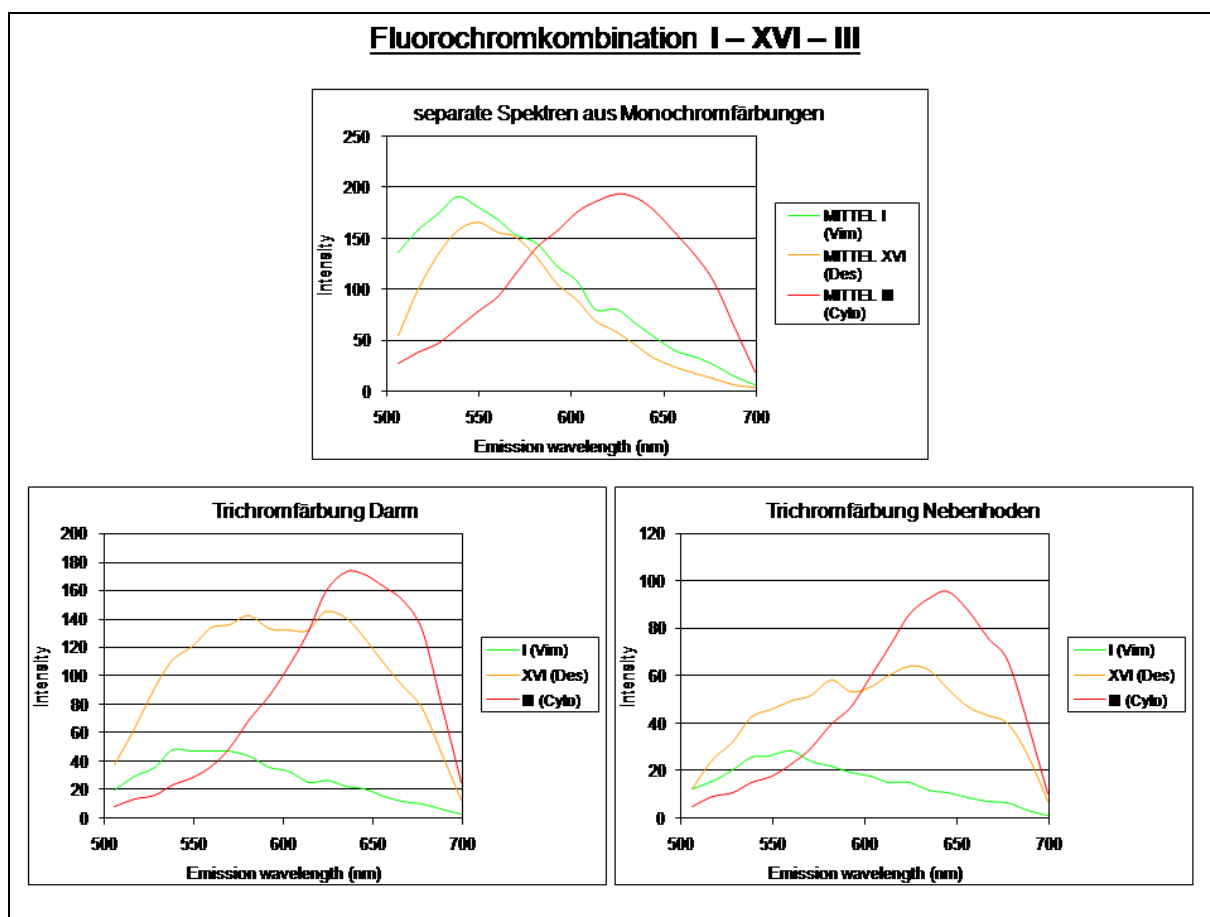
Eigenschaften des grün (I) und rot emittierenden (III) Farbstoffes sind wie schon bei allen anderen Farbstoffkombinationen zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen identisch. Das gelb emittierende Fluorochrom (XV) zeigt in den Dreifachfärbungen ein Emissionsmaximum bei 581 nm und einen weiteren Peak im Bereich des Emissionsmaximums von Fluorochrom III. Damit erfolgt eine spektrale Verschiebung der Emission des Farbstoffes XV um ca. 32 nm. Die Intensität und die Spezifität der einzelnen Farbstoffe in den Trichromfärbungen sind ausgezeichnet, mit der Ausnahme der dezenten Überlagerung des Desmins durch den Farbstoff III. Diese Eigenschaften der genannten Farbstoffkombination sind ebenso in verschiedenen Organen reproduzierbar. Die Kombination der Farbstoffe I – XVI – III (Abb. 22) ähnelt in ihren Eigenschaften der Fluorochromkombination I – XIV – III mit ebenfalls keinen größeren



**Abb. 21** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe I, XV und III in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

Unterschieden in den spektralen Eigenschaften des grün (I) und rot emittierenden (III) Farbstoffes zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen. Minimale Abweichungen können durch nicht 100% selektive ROIs erklärt werden. Das Emissionsmaximum des gelb markierten Desmins (Fluorochrom XVI) verschiebt sich ebenfalls um 32 nm auf 581 nm gegenüber den ermittelten Eigenschaften aus der Einzelmarkierung. Die spektralen Eigenschaften ähneln sich in den untersuchten Organen. Erneut lässt sich eine milde Überlagerung durch den Farbstoff III nachweisen.

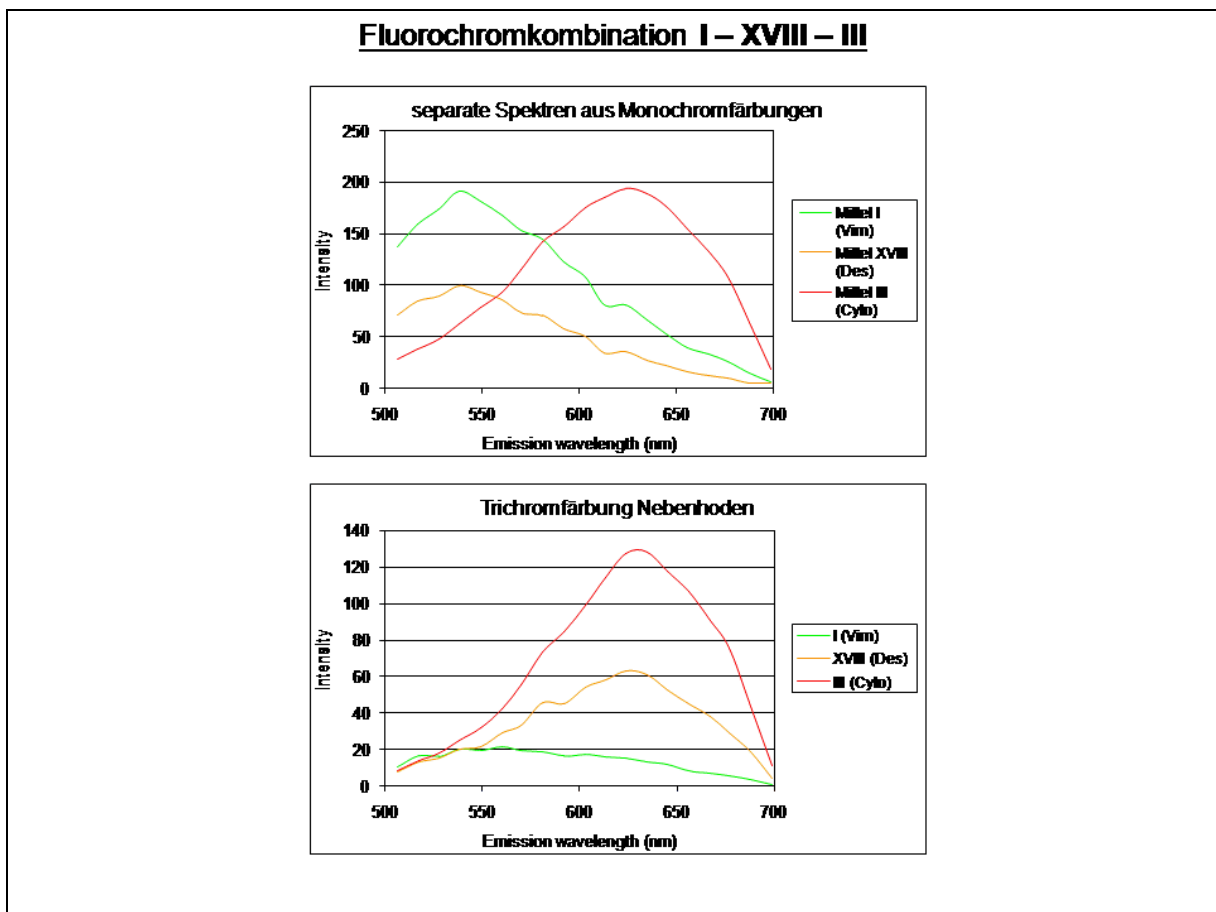
Die Fluorochromkombinationen I – XVIII – III (Abb. 23) und I – XIX – III (Abb. 24) zeigen ähnliche Eigenschaften in den Trichromfärbungen. Die spektralen Eigenschaften des grün (I) und rot emittierenden (III) Farbstoffes zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen sind zwar identisch,



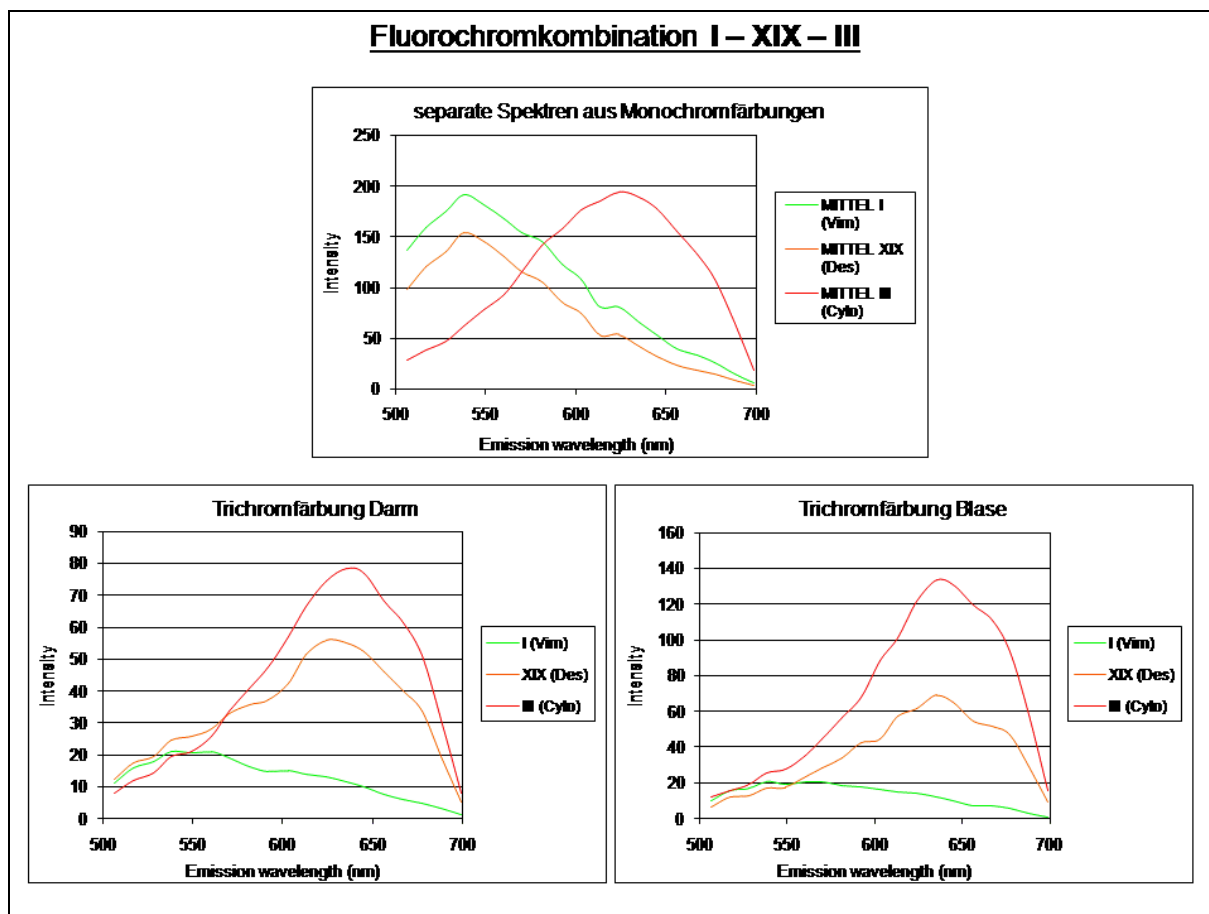
**Abb. 22** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe I, XVI und III in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

allerdings ist die Überlagerung des gelb markierten Cytofilamentes mit dem rot emittierenden Farbstoff **III** deutlicher ausgeprägt. Für das jeweils gelb emittierende Fluorochrom lässt sich weiterhin ein Peak bei 581 nm finden. Damit erfolgt eine Verschiebung des Emissionsmaximums im Vergleich zur Monochromdarstellung um 43 nm (vergleichbar mit Farbstoff **XI**). Die spektralen Eigenschaften unterscheiden sich nicht wesentlich in den verschiedenen Organen.

Wie bei allen anderen Farbstoffkombinationen lassen sich bei der Trichromfärbung mit den Substraten **I** – **XXIII** – **III** auch keine Unterschiede in den spektralen Eigenschaften des grün (I) und rot emittierenden (III) Farbstoffes zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen aufzeigen (**Abb. 25**). Beide Substrate zeigen jeweils übereinstimmende Emissionsmaxima in den durchgeführten  $\lambda$ -Scans. Das Emissionsmaximum des gelb emittierenden



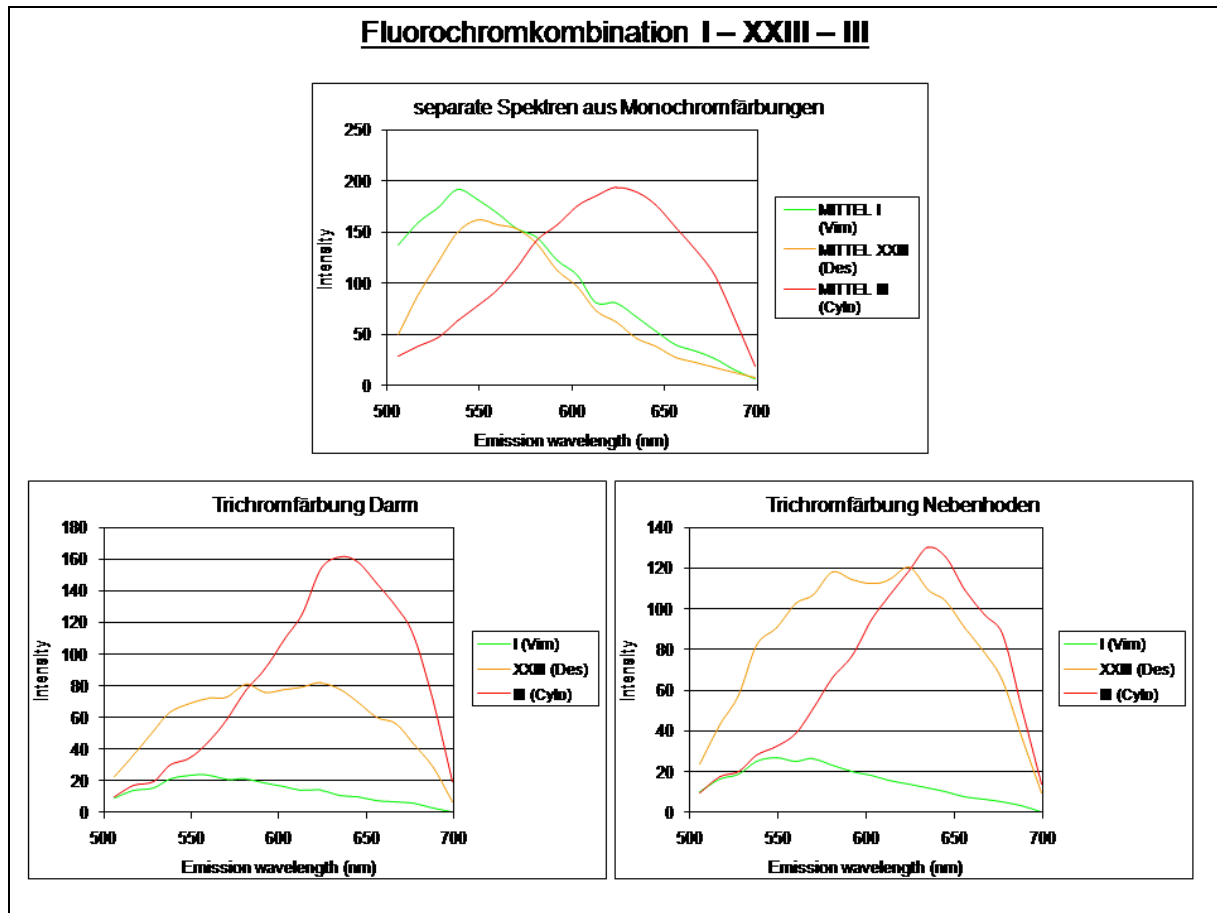
**Abb. 23** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XVIII** und **III** in Monochromfärbungen und simultaner Trichromfärbung (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines confokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).



**Abb. 24** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XIX** und **III** in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

Fluorochroms **XXIII** verschiebt sich um 32 nm auf 581 nm gegenüber den ermittelten Spektren aus der Einzelmarkierung. Die Eigenschaften der Trichromfärbung sind in verschiedenen Organen reproduzierbar. Wiederum lässt sich eine geringfügige Überlagerung durch den Farbstoff **III** nachweisen.

Die Fluorochromkombination **I – XXIV – III** (**Abb. 26**) besitzt ähnliche Eigenschaften wie die oben beschriebenen Kombinationen der Farbstoffe **I – VII – III**, **I – XIII – III** und **I – XV – III**. Die Eigenschaften des grün (I) und rot emittierenden (III) Farbstoffes sind wie schon bei allen anderen Farbstoffkombinationen zwischen den simultanen Trichromfärbungen und den Monochromfärbungen identisch. Beide Substrate zeigen jeweils übereinstimmende Emissionsmaxima in den durchgeführten  $\lambda$ -Scans. Das gelb emittierende Fluorochrom **XXIV** zeigt in den Dreifachfärbungen ein Emissionsmaximum bei 581 nm und einen weiteren Peak im Bereich des

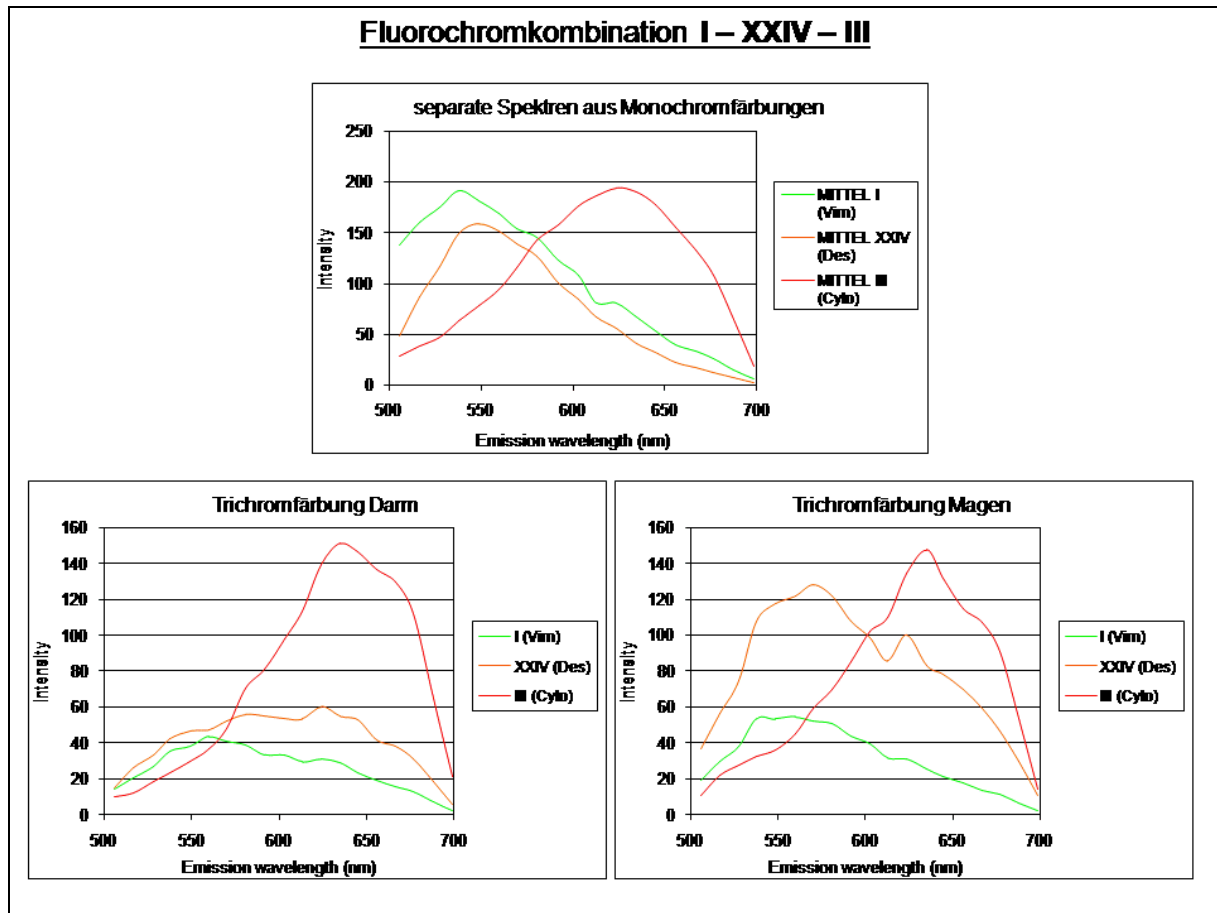


**Abb. 25** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XXIII** und **III** in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

Emissionsmaximums von Fluorochrom **III**. Damit erfolgt eine spektrale Verschiebung der Emission (bathochromer shift) des Farbstoffes **XXIV** um ca. 32 nm bei gleichzeitiger minimaler Überlagerung mit dem rot emittierenden Farbstoff. Die Intensität und die Spezifität der einzelnen Farbstoffe in den Trichromfärbungen sind wie bei den anderen drei genannten Farbstoffkombinationen ausgezeichnet, mit der Ausnahme der dezenten Überlagerung des Desmins durch den Farbstoff **III**. Diese Eigenschaften der genannten Farbstoffkombination sind in verschiedenen Organen reproduzierbar.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Fluorochromkombinationen **I – VII – III**, **I – XIII – III**, **I – XV – III** und **I – XXIV – III** auch objektiv in der spektralen Auswertung mittels  $\lambda$ -Scans der einzelnen Trichromfärbungen die besten Ergebnisse liefern. Sie



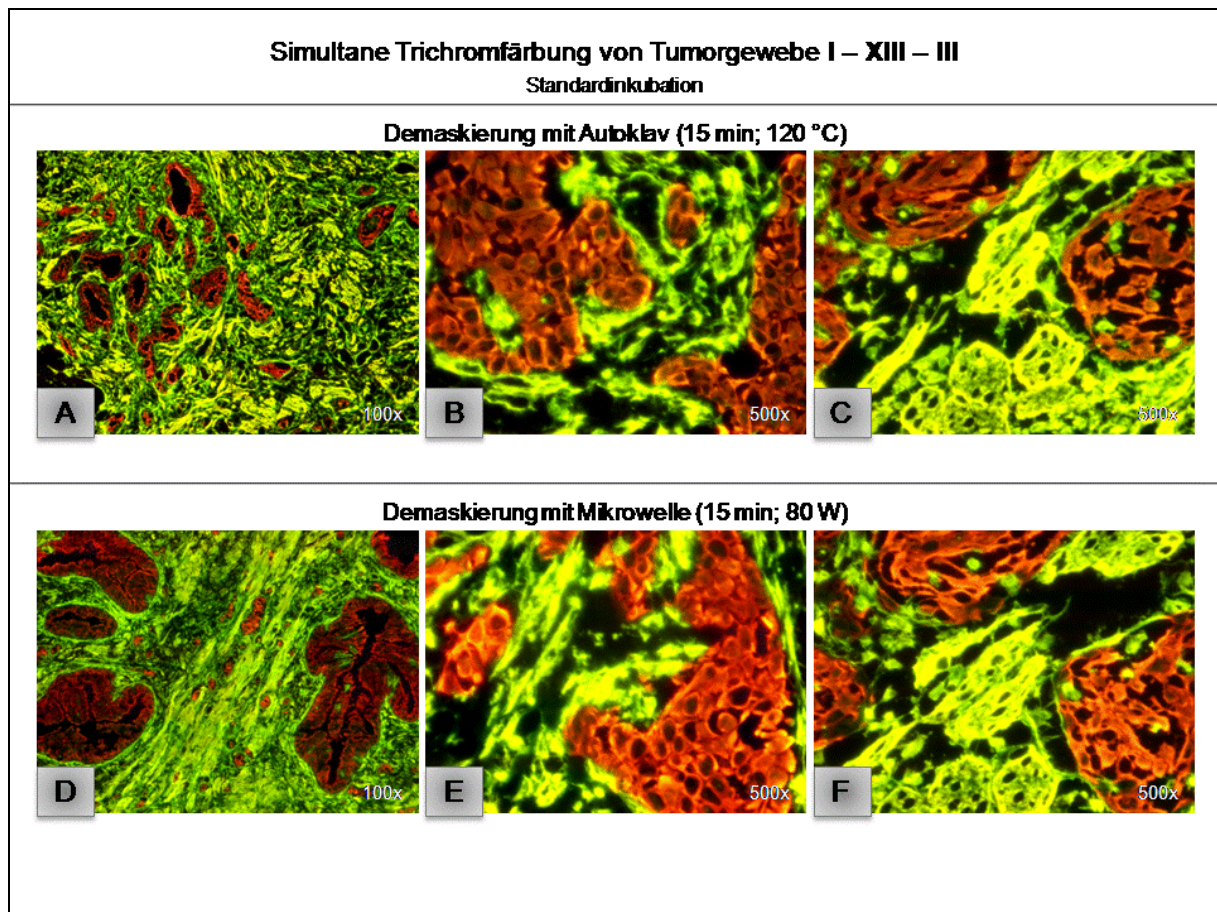


**Abb. 26** Gegenüberstellung der spektralen Eigenschaften der Farbstoffe **I**, **XXIV** und **III** in Monochromfärbungen und simultanen Trichromfärbungen (Cryostatschnitte) mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes der Firma Zeiss (LSM 510 META,  $\lambda_{\text{Exc}} = 488 \text{ nm}$ ).

kennzeichnen sich durch hohe Intensität und Spezifität der einzelnen Farbstoffe. Dadurch lassen sich die markierten Zellstrukturen sehr gut differenzieren und mit hoher Lokalisationstreue abbilden. Alle gelb emittierenden Fluorochrome zeigen in den simultanen Dreifachmarkierungen einen bathochromen shift des Emissionsmaximums auf 581 nm und damit in den länger welligen Bereich. Die Eigenschaften des grün (**I**) und rot emittierenden (**III**) Farbstoffes bleiben gegenüber den Monochromfärbungen unverändert. Auffallend ist eine (abhängig von den Substratkombinationen) mehr oder weniger ausgeprägte Überlagerung des gelb markierten Desmins mit dem rot emittierenden Fluorochrom **III**, welche wahrscheinlich auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Substraten zurückzuführen ist.

Simultane Trichrommarkierungen von Tumorgewebe

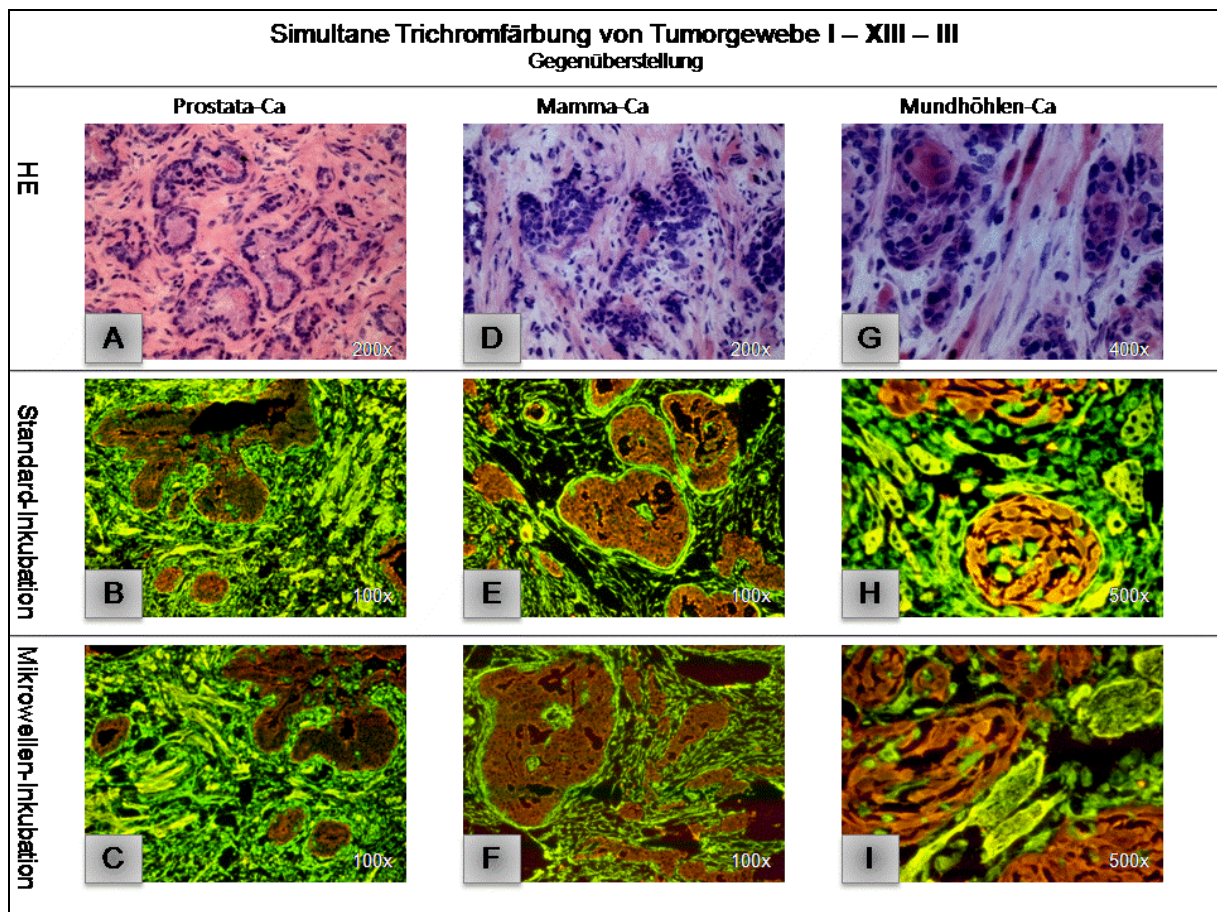
Die Übertragung der Methodik von Rattengewebe auf humanes Tumorgewebe stellt einen wichtigen Schritt in der Errichtung einer Anwendbarkeit im Sinne der histopathologischen Diagnostik dar. Dazu wurden Mamma-, Prostata- und Mundhöhlenkarzinome (Cryostatschnitte aus dem Eingangsgut des Instituts für Pathologie der FSU Jena, Dicke ca. 5 µm) mit der Substratkombination **I – XIII – III** im Konzentrationsverhältnis 3x – 0,5x – 0,5x gefärbt. Zunächst wurde die Standardinkubationsvorschrift getestet (Antikörper über Nacht, Substrate 1 h RT) mit unterschiedlichen Demaskierungsvarianten (Autoklav vs. Mikrowelle) (**Abb. 27**). Beide Versuchsreihen lieferten hervorragende Trichromfärbungen mit hoher Intensität und Spezifität der einzelnen Fluorochrome und stets geringem Background.



**Abb. 27** Simultane Trichromfärbung unterschiedlicher Karzinome mittels Standard-Inkubationsvorschrift (Blauanregung). **A-C** Demaskierung im Autoklaven (Standard-Inkubation). **D-F** Demaskierung mit Mikrowelle. Prostata-Ca **A+D**; Mamma-Ca **B+E**; Mundhöhlen-Ca **C+F**. Vimentin grün (**I**); Desmin gelb (**XIII**); Cytokeratin rot (**III**).

Die Demaskierung im Autoklav zeigte leichte Vorteile bei der Markierung von Prostata-Ca in Bezug auf den gelb und rot emittierenden Farbstoff und ermöglicht dadurch eine noch eindeutigere Diskriminierung der markierten Targets. Für Mamma- und Mundhöhlenkarzinom lieferte die Demaskierung mit Mikrowelle leicht intensivere Färbungen des Cytokeratins.

In einem weiteren Schritt wurde getestet, ob die simultanen Trichromfärbungen an humanem Tumorgewebe auch mit Mikrowellen-Inkubation realisierbar sind. **Abb. 28** zeigt eine Gegenüberstellung von HE-Färbungen und trichromen Fluoreszenzfärbungen (Standard- und Mikrowellen-Inkubation) der 3 untersuchten Tumorentitäten. Sowohl Standard- als auch Mikrowelleninkubation liefern ausgezeichnete Dreifachmarkierungen auf nahezu gleichem Niveau. Alle drei Targets lassen sich äußerst präzise und scharf voneinander abgrenzen bei hoher Fluoreszenzintensität und minimalem Background.



**Abb. 28** Gegenüberstellung von HE-Färbungen und simultanen Fluoreszenz-Trichromfärbung (Standard vs. Mikrowelle). **A-C:** Prostata-Ca. **D-F:** Mamma-Ca. **G-I:** Mundhöhlen-Ca. Verwendete Substratkombination (Fluoreszenzfärbung) I – XIII – III (s.o.).

## 8. Diskussion

### 8.1. Neue Reaktivfluorochrome und ihre Eigenschaften in Einzelsystemen

Alle getesteten Substrate zeigen exzellente Fluoreszenzeigenschaften in immunhistochemisch gefärbten Geweben. Wie **Abb. 13 – 16** zeigen, zeichnen sie sich durch hohe Intensität, intra- und interorganische Spezifität, Lokalisationstreue, Photostabilität und minimalen Background aus. Zudem sind die spektralen Eigenschaften innerhalb eines und zwischen den verschiedenen Organen identisch. Lediglich Fluorochrom **I** zeigt leichte unspezifische Färbungen bei sonst geringem Background. Auch Farbstoff **XIX** zeigt geringfügige, substratsinduzierte Hintergrundfluoreszenz. Diese Eigenschaften sind grundlegend mit der Fähigkeit verbunden, in einem einzigen Kondensationsschritt (oxidativ) kovalente Bindungen mit umgebenden Biomolekülen einzugehen. Nachträgliche Diffusionsartefakte treten praktisch nicht auf. Wie schon zuvor von unserem Institut publiziert, konnte im Gegensatz zu Alexa-Tyramiden eine verbesserte Spezifität bei geringerem Background nachgewiesen werden. FITC-markierte sekundäre Antikörper zeigen zwar ähnlich wenig Background wie die neuen Reaktivfluorochrome, allerdings sind sie bezüglich ihrer Spezifität den ABC-gekoppelten Alexa-Tyramiden und den hier beschriebenen Reaktivfluorochromen unterlegen (vgl. Krieg und Halbhuber 2004). Diese neuen Substrate stellen derzeit die kleinsten Substrate für den Fluoreszenz-Nachweis von PO dar. Durch ihre chemischen Eigenschaften sind (im Unterschied zu klassischen Fluorochromen) Fluoreszenzanregung und -emission relativ breitbandig. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, unter Selektion geeigneter Substrate und Ausnutzung halochromer Effekte, simultane Trichromfärbungen mit einer einzigen Fluoreszenzanregungswelle zu realisieren (Krieg 2006, Krieg *et al.* 2008).

### 8.2. Simultane Trichromfärbungen

Die optimierten Substratkombinationen (**Tab. 3**) ermöglichen sehr gut differenzierbare Dreifachfärbungen, wobei sich Unterschiede vor allem in der

Intensität der Cytokeratin- und/oder Desminmarkierung zeigen. Als grün emittierender Farbstoff für die Vimentin-Markierung zeigte sich Fluorochrom **I** dem Fluorochrom **II** in Mehrfachfärbungen überlegen. In Bichromfärbungen (Vimentin mit Substrat **II** markiert und Desmin variabel mit gelb emittierenden Substraten markiert) zeigte sich zum Teil vermehrte Hintergrundbeleuchtung und schwieriger zu differenzierende Strukturen durch Annäherung der Emissionswellenlängen. In einzelnen Fluorochromkombinationen waren sowohl Vimentin als auch Desmin grün emittierend, welches die Differenzierung erheblich erschwert. Außerdem zeigte Fluorochrom **I** intensivere Markierungen. Der rote Farbstoff **IV** kennzeichnete sich in Bichromfärbungen durch matt, rostbraune Cytokeratinmarkierungen. Mit Ausnahme der Niere, zeigten sich in anderen Organen wenig intensive Färbungen des mit Fluorochrom **IV** markierten Targets. Damit ist es Fluorochrom **III** klar in seinen Eigenschaften (bezüglich der Realisierbarkeit von Trichromfärbungen) unterlegen. Beste Ergebnisse in den simultanen Dreifachfärbungen ließen sich subjektiv mit den Substratkombinationen **I – VII – III**, **I – XV – III**, **I – XXIV – III** und **I – XIII – III** erzielen, welches sich auch durch Untersuchungen der spektralen Eigenschaften (mittels  $\lambda$ -Scans) objektiv belegen lässt.

Auffallend ist eine gelegentliche Überlagerung des gelb markierten Desmins durch das rot emittierende Fluorochrom **III** in den Dreifachfärbungen. Möglicherweise wird dies durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen den gelb emittierenden Substraten und dem Substrat **III** verursacht. Denkbar sind auch Auswirkungen der mehrfach stattfindenden Inkubationsschritte. Desweiteren zeigen alle gelb emittierenden Fluorochrome in den simultanen Dreifachmarkierungen einen bathochromen Shift des Emissionsmaximums auf 581 nm. Die Eigenschaften des grün (**I**) und rot emittierenden (**III**) Farbstoffes bleiben dagegen (gegenüber den Monochromfärbungen) unverändert. Diese Veränderungen des gelb emittierenden Farbstoffs haben den Vorteil, dass sich selbst feine morphologische Strukturen besser gegenüber dem grün markierten Vimentin abgrenzen lassen. Wenn die Überlagerungen zu stark werden (abhängig von Substratkombination und z.B. Dicke der Muskelschicht), kann dies die Differenzierung zwischen Desmin und Cytokeratin beeinträchtigen. Besonders die Fluorochrome **VII**, **XIII**, **XV** und **XXIV** zeichnen sich in den Dreifachfärbungen durch relativ geringfügige Interaktionen mit dem rot emittierenden Fluorochrom **III** aus.



### 8.3. Mikrowellen-Inkubation

Da die Dreifachmarkierung mit der Standard-Inkubationsvorschrift vier Tage benötigt, wurde mittels der Mikrowellentechnik versucht, bei möglichst identischer Markierungsqualität eine Reduzierung der Inkubationsdauer zu erzielen. Für alle Schnitte ist die Vimentin-Primärantikörperinkubation mit Mikrowelle anwendbar und mit Ausnahme von Semidünnschnitten ist auch die Verkürzung der Cytokeratin-Primärantikörperinkubation auf 2 h RT möglich. Die Substrat-Inkubation lässt sich bei Cryostatschnitten mit Mikrowelle von 1 h bei RT (Standard) auf 10 min reduzieren (siehe 6. Methodische Optimierung). Damit lässt sich die Inkubationsdauer für Dreifachmarkierungen auf zwei Tage (Cryostat- und Paraffinschnitte) bzw. auf drei Tage (Semidünnschnitte) verkürzen, was einen erheblichen Zeitvorteil bringt. Die Resultate für simultane Trichromfärbungen mit Standard- und Mikrowelleninkubation sind von ihren Eigenschaften her vergleichbar (vgl. **Abb. 5 + 6**). Mit Mikrowellentechnik kommt das Vimentin sogar noch intensiver grün emittierend zur Darstellung – dies bei gleichbleibend minimalem Background.

Markierte Cryostat- und Paraffinschnitte unterscheiden sich kaum in ihren Eigenschaften. Zum Teil findet sich etwas mehr Hintergrundfluoreszenz in Paraffinschnitten. In Semidünnschnitten ist mit Ausnahme der Cytokeratinmarkierung die Fluoreszenzintensität etwas geringer, welches auch die Diskriminierung zwischen grün markiertem Vimentin und gelb markiertem Desmin erschwert (vgl. **Abb. 6**). Dies lässt sich am ehesten auf die geringe Schnittdicke von 1 µm zurückführen, welche aber einen hohen visuellen Netto-Informationsgewinn durch weniger Überlagerung als Vorteil hat. Auch in Semidünnschnitten ist der Background äußerst gering. Diese Ergebnisse korrelieren mit Weise *et al.* 2005, die mit Mikrowelle die Effizienz (Zeitersparnis und Signalverstärkung) von Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) steigern konnten.

### 8.4. Histopathologische Diagnostik

Die Anwendung der optimierten simultanen Trichromfärbung an humanem Tumorgewebe zur histopathologischen Diagnostik ist sehr gut möglich. In den drei

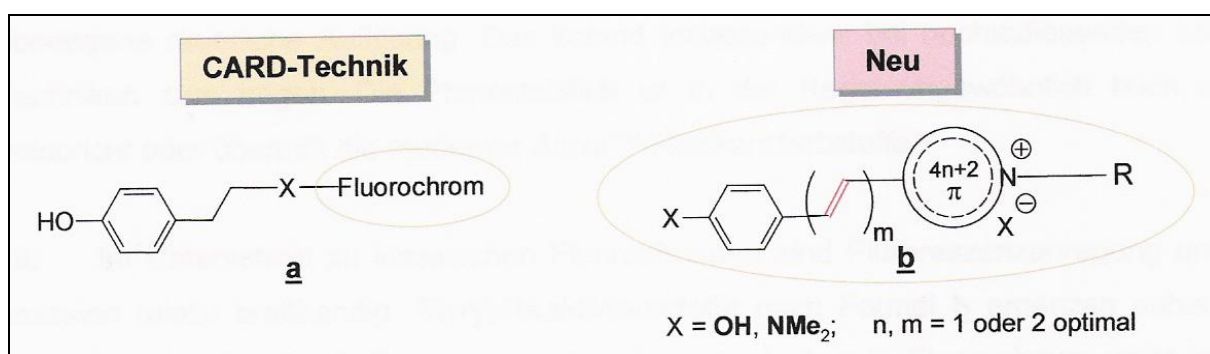
untersuchten Tumoren lassen sich die karzinomatös veränderten Gang- und Drüsenstrukturen (Mamma- und Prostata-Ca) sowie Plattenepithelnester (Mundhöhlen-Ca) hoch-sensitiv darstellen. Sowohl die Standard- als auch die verkürzte Mikrowelleninkubationstechnik lassen eine hochauflösende Differenzierung der markierten Targets (Vimentin, Desmin, Cytokeratin) zu (vgl. **Abb 27 + 28**). Die Fluoreszenzmarkierung lässt keine eindeutige Differenzierung zwischen normalem, hyperplastischem und/oder pathologischem Epithel zu. Daher ist es immer notwendig, eine HE-Übersichtsfärbung zur Darstellung histopathologischer Merkmale (wie Kernatypien, Kern-Plasma-Relation etc.) anzufertigen. Allerdings lassen sich mit der Fluoreszenzfärbung selbst kleine versprengte Mikrosatelliten hoch-sensitiv im infiltrierten Brüstdrüsengewebe darstellen.

Somit eröffnet die simultane Darstellung verschiedener Targets (max. drei) mit den hier eingesetzten Farbstoffen auch ein potentiell hilfreiches Werkzeug zur Darstellung und Differenzierung tumorspezifischer Gewebemarker und deren Expression (z.B. Laminin, MMP, her2-neu, Rezeptoren).

### **8.5. Struktur – Eigenschafts – Beziehungen eingesetzter Farbstoffe**

Die an unserem Institut entwickelten Substrate sind oxidativ sich selbst-verankernde fluoreszente Reporter mit einem voll konjugierten  $\pi$ -System, welches an der Verankerung teilnimmt: (**Abb. 29; b**) Die kovalente Bindung erfolgt über die ortho-Position, wobei durch  $\pi$ -Systeme des Reaktionspartners ein insgesamt verlängertes  $\pi$ -System entstehen kann. Daraus ergeben sich unterschiedliche physikochemische Eigenschaften für Substrat und finales Produkt.

Für die histochemisch-apparative Kompatibilität sind primär die spektralen Eigenschaften ausschlaggebend. Für die Empfindlichkeit ist vor allem die Substrat-Reaktivität entscheidend. Dieser Faktor kann durch Variation der Substrat-Konzentration gut eingestellt und bei wenig reaktiven Substraten (freie heterozyklische N-Basen, vergleiche **Abb. 29 b** ohne R-Substituenten) kompensiert werden. Beide Punkte werden durch die chemische Struktur festgelegt und sind rational im Einzelnen nicht determinierbar.

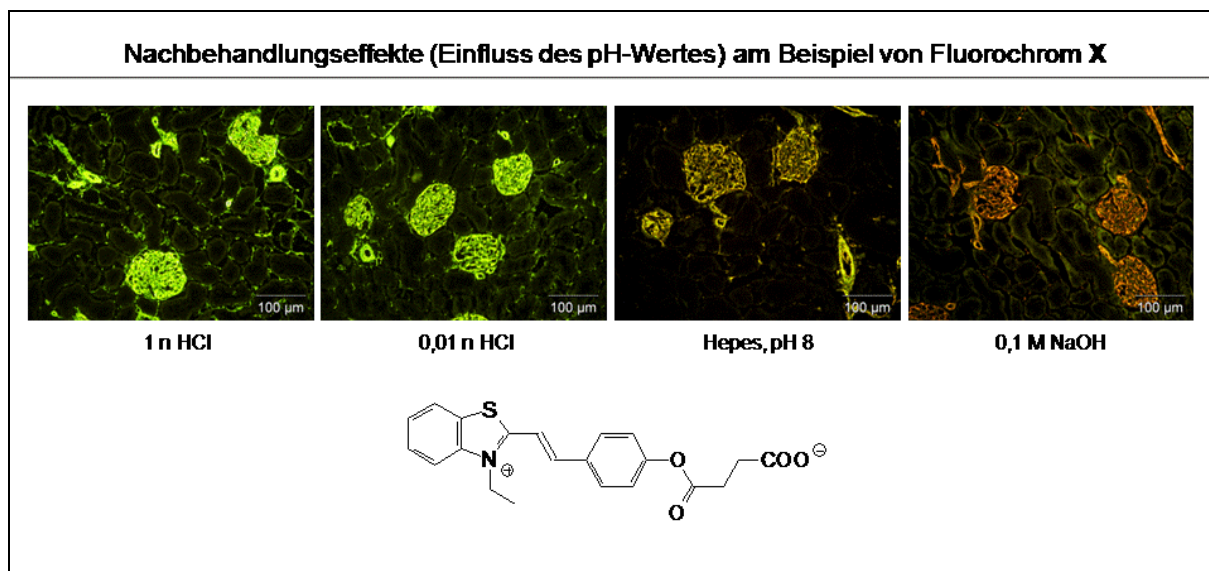


**Abb. 29** Strukturelle Gegenüberstellung Fluorochrom-Tyramin-Konjugate (**a**) und selbstankernder Reaktivfluorochrome (**b**). Bildquelle: Krieg 2006.

Die Anzahl der konjugierten  $\pi$ -Elektronen hat den größten Einfluss auf die spektralen Eigenschaften und Verankerungsfähigkeit. Bezüglich der Farbstoffeigenschaften (Gesamtheit von Farbe/Absorption  $\rightarrow$  Anregungswellenlänge und Fluoreszenzemission) gilt grob, dass mit zunehmender Größe des  $\pi$ -Systems (d.h. mit zunehmenden  $n$  und  $m$  in Formel **b** in **Abb. 29**) sich die spektralen Eigenschaften bathochrom verschieben. Allerdings besteht hierbei auch eine pH Abhängigkeit. So können Phenolderivate (Formel b in Abb. 29 mit  $X = OH$ ) im basischen deprotoniert werden und gehen dabei in die sog. Merocyanin-Form über. Das umgekehrte gilt für Amine mit  $X = NMe_2$ , welche im Säuren protoniert werden. In beiden Fällen werden dabei grundlegend neue chromophore Gruppen erhalten und damit signifikante spektrale Shifts erzeugt. Wir haben diese Effekte ausgenutzt, um im Zuge einer Nachbehandlung (Spülen mit 0,1 N HCl) spektrale Anregungsbereiche (hier meist Blauanregung) und färberische „Gesamteigenschaften“ (Minimierung des cross-talks, maximale Fluoreszenzquantenausbeuten) empirisch zu optimieren. Dass sogar nicht-deprotonierbare und Aminogruppen-freie und damit nicht in eine Merocyanin-Form überführbare Phenolester ausgeprägt auf pH-Änderungen reagieren, zeigt **Abb. 30**. R wirkt als Modulator unterschiedlicher Parameter und beeinflusst vor allem Photostabilität, Löslichkeit, Fluoreszenz-Intensität und Nachweis-Spezifität. Die hier eingesetzten Farbstoffe stellen die kleinstmöglichen PO-Substrate dar und zeichnen sich gegenüber ihren Tyramid-Analoga durch einen minimalen Besatz mit funktionellen Gruppen aus. So tragen viele konventionelle Farbstoffe wie Alexa-Tyramin-Konjugate z.B. Sulfonsäuregruppen, welche ursprünglich als löslichkeitsvermittelnde Gruppen (Wasserlöslichkeit) eingebracht wurden. Diese



begünstigen unspezifische Interaktionen mit unterschiedlichsten zellulären Bestandteilen und führen damit über eine Background-Erhöhung zu einer deutlich unspezifischeren und auch unempfindlicheren Nachweisreaktion.



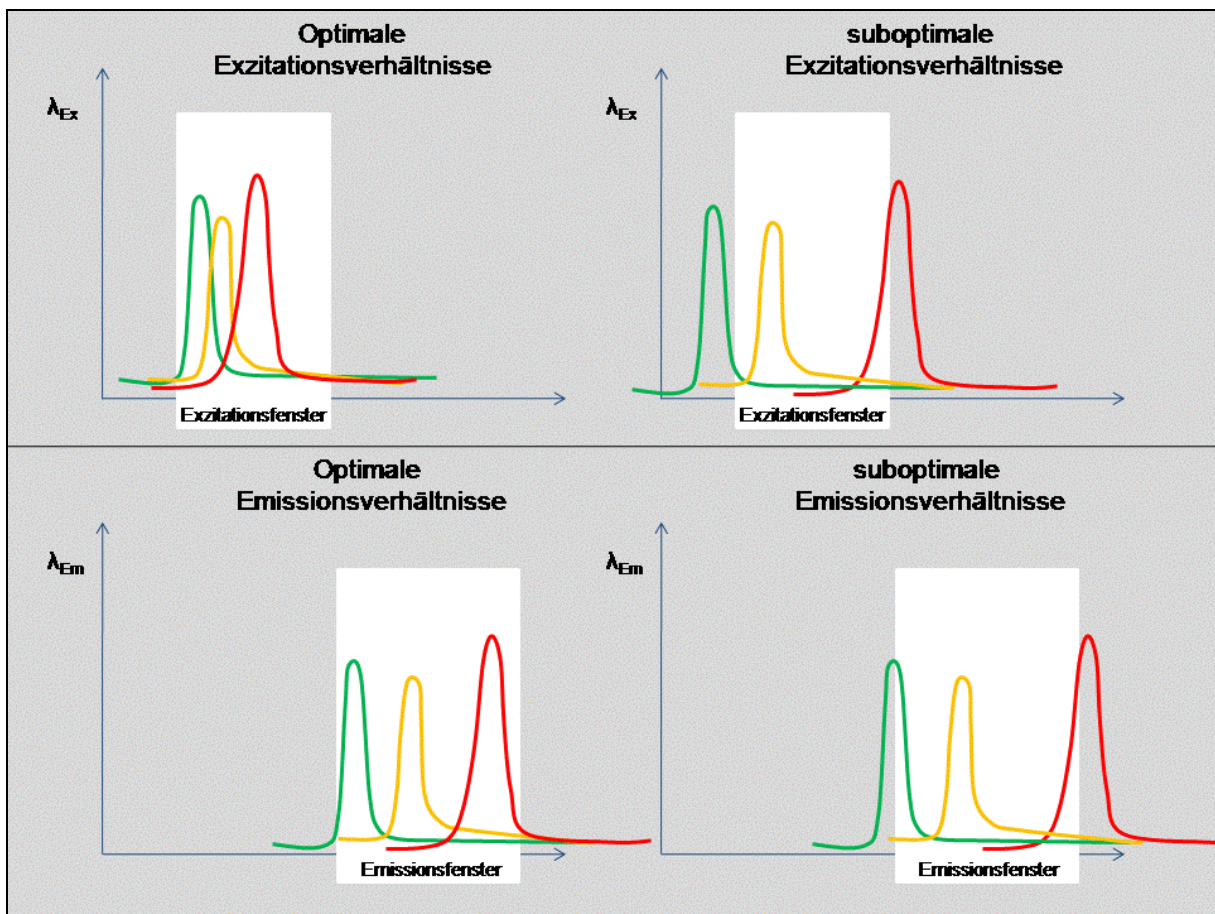
**Abb. 30** pH-Abhängigkeit der spektralen Eigenschaften am Beispiel von Fluorochrom X. Mit Verschiebung des pHs der Spülung im Sinne einer Nachbehandlung in Richtung basischen Bereich kommt es allein auf dieser Grundlage zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsspektrums. Dabei ist kein Einfluss der pH-Änderung auf die Spezifität der Färbung erkennbar (Jenalumar; Blauanregung).

Die Markierungsergebnisse sind außerdem abhängig von den Inkubationsbedingungen, Nachbehandlung, Umgebungseffekte auf zellulärer Ebene und Art des zu markierenden Gewebes (Cryostat, Paraffin, Semidünn). Verantwortlich hierfür sind zahlreiche, kaum voneinander separierbare physiko-chemische Effekte (Reaktions- und Diffusionsgeschwindigkeiten, Antigenizität/Epitopzugänglichkeit, ...)

(Krieg und Halbhuber 2004, Krieg 2006, Krieg *et al.* 2007, Krieg *et al.* 2008)

Durch die individuellen Eigenschaften der Substrate in Einzelsystemen (bedingt durch deren individuelle Struktur und Reaktion auf Umgebungseinflüsse, s.o.) ergeben sich erschwerte Bedingungen für die gleichzeitige Darstellung der markierten Targets in der Dreifachmarkierung. Zum einen muss gewährleistet sein, dass alle drei simultan verwendeten Farbstoffe mit derselben Wellenlänge im

ausgewählten Exzitationsfenster suffizient anregbar sind. Fallen die Exzitationsmaxima zu einer der beiden Grenzen heraus, ist auch mit einem dementsprechenden Verlust an Emissionsintensität, bis zum völligen Verschwinden des Signals bei komplettem Verlust der Anregbarkeit, zu rechnen. Bei den hier verwendeten Farbstoffen ist dieses Problem nahezu vernachlässigbar, da alle verwendeten Substrate sehr gut im Blauen anregbar sind, ohne genaue Aussagen dazu machen zu können, ob alle Exzitationsmaxima wirklich im benutzten Anregungsfenster liegen. Ähnlich verhält es sich für die Emissionsspektren und deren Maxima, die optimalerweise auch in dem eingesetzten Emissionsfenster liegen sollten. Dies würde die bestmögliche Darstellung der drei markierten Targets mit unterschiedlichen Farbeigenschaften geben, wenn zusätzlich auch noch die Abstände zwischen den Peaks der einzelnen Emissionsspektren weit möglichst von einander entfernt wären (vgl. **Abb. 31**).



**Abb. 31** Darstellung optimaler bzw. suboptimaler Exzitations- und Emissionsverhältnisse im Bezug auf eine simultane Trichromfärbung bei einer einzigen Anregungswellenlänge.

Diesen optimalen Zustand zu erreichen ist sicherlich nahezu ausgeschlossen, gerade wenn eine simultane Darstellung bei einer Anregungswellenlänge realisiert werden soll. Um sich diesem Optimum anzunähern, wurde ein empirischer Ansatz gewählt. In Bezug auf die hier verwendeten Reaktivfluorochrome wäre es idealerweise wünschenswert, ein grün, ein gelb und ein rot emittierendes Signal zu bekommen. Dementsprechend wurden aus den Einfachmarkierungen geeignete Substrate mit möglichst weit auseinanderliegenden Emissionsmaxima und möglichst guter Anregbarkeit im Blauen ausgewählt. Problematisch war es, geeignete gelb-emittierende Farbstoffe zu selektieren, da häufig die Emissionswellenlänge im grün-gelben Bereich lag, wobei die Eigenschaften im Einzelsystem noch keine endgültigen Rückschlüsse auf das Verhalten des Farbstoffes in der Kombination und auf die mehrfach wiederholten Inkubationsprozeduren zulassen. Chinolinium-Derivate zeichnen sich i.d.R. in dem Zusammenhang dadurch aus, dass ihre Emissionsmaxima im Gelben liegen. Damit sind sie, im Vergleich zu den meisten Pyridinium-Derivaten, noch besser für die Desmin-Markierung in der Trichromfärbung geeignet. In den Dreifachfärbungen ist auffällig, dass der gelb emittierende Farbstoff einen bathochromen shift im Vergleich zu seinen Emissionseigenschaften im Einzelsystem vollführt. Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass der rot emittierende Farbstoff III mit seinem Peak rechts aus der Emissionsbande herausrutscht. Dadurch kommt es zu einem Summationseffekt zwischen den gelb und rot emittierenden Kurven, wodurch ein bathochromer shift der gelben Emission erzeugt wird (→gelb-gelborange). Für unseren Farbstoffkasten ist dieser Effekt allerdings von Vorteil, da diese erzeugte Dehiszenz der Maxima von grün und gelb emittierenden Fluorochrom eine deutlich bessere Differenzierung der markierten Targets in den Dreifachfärbungen ermöglicht. Die Emissionsmaxima des grün und rot emittierenden Fluorochroms zeigen dagegen keine Unterschiede zwischen Einzel- und Mehrfachmarkierungen.

## 9. Schlussfolgerungen

Die neuen Reaktivfluorochrome sind hoch potent für den Nachweis von peroxidatischer Aktivität in fixierten Zellen und Geweben und stellen damit ein hervorragendes Werkzeug für die Zellbiologie dar.

Im Gegensatz zu den in CARD verwandten Tyramin-Fluorochrom-Konjugaten sind Anker- und Reporterfunktion nicht mehr voneinander getrennt. Damit stellen die neuen Substrate die derzeit kleinsten und leistungsfähigsten Substanzen für den Fluoreszenz-Nachweis von PO dar. Sie kennzeichnen sich durch eine relativ breitbandige Fluoreszenzanregung und Emission. Selektierte Substrate ermöglichen eine exzellente Lokalisation bei hoher Sensitivität, Spezifität, hervorragender Photostabilität und minimalem Background. Die Fluoreszenzsignale lassen sich sowohl mittels Standard Epi- und confocaler Laser-Scanning-Mikroskopie darstellen.

Aufgrund dieser Eigenschaften, einer optimierten Inkubationsvorschrift und der Kombination selektierter Substrate lassen sich simultane multichrome Darstellungen von bis zu drei verschiedenen Targets bei einer Anregungswelle realisieren. Die trichromen Markierungen sind hochspezifisch und lassen sich auch in die histopathologische Diagnostik von humanen Tumoren übertragen.

Durch Einführung der Mikrowellen-assistierten Inkubation lässt sich die Inkubationsdauer für Dreifachfärbungen auf zwei Tage reduzieren, bei mindestens gleichbleibender Qualität der Markierungen.

## 10. Literatur- und Quellenverzeichnis

**Antopol** W, Glaubach S, Goldman L. 1948. Effects of a new tetrazolium derivative on tissue, bacteria and onion root tips. Public Health Repts, 63:1231-1238.

**Atkinson** E, Melvin S, Fox SW. 1950. Some properties of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and several iodo derivatives. Science 14(111):385-387.

**Batten** BE, Robinson JM. 1989. Preliminary observations using scanner laser confocal microscopy. Anat Rec, 223, 12a.

**Berger** DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. 2002. Das Rote Buch, Hämatologie und internistische Onkologie. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Ecomed Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG.

**Bobrow** MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J Immunol Methods, 125:279-285.

**Bobrow** MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J. 1992. The use of reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. J Immunol Methods, 150:145-149.

**Bourne** JA. 1992. Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden. Immunochemistry Laboratory, DAKO Corporation.

**Böck** P, Hrsg. 1989. Romeis, Mikroskopische Technik; 17. neubearbeitete Auflage. Urban & Schwarzenberg.

**Brakenhoff** GJ, van der Voort HTM, van Spronsen EA, Nanninga N. 1988. 3-dimensional imaging of biological structures by high resolution confocal scanning laser microscopy. Scanning Microscopy, 2:33-40.

**Chadwick** CS, McEntegart MG, Nairn RC. 1958a. Fluorescent protein tracers; a trial of new fluorochroms and the development of an alternative to fluorescein. *J Immunol*, 1(4):315-27.

**Chadwick** CS, McEntegart MG, Nairn RC. 1958b. Fluorescent protein tracers; a simple alternative to fluorescein. *Lancet*, 1(7017):412-4.

**Chao** J, DeBiasio R, Zhu Z, Gluliano KA, Schmitdt BF. 1996. Immunofluorescence signal amplification by the enzyme – catalyzed deposition of a fluorescent reporter substrate (CARD). *Cytometry*, 23:48-53.

**Chayen** J, Bitensky L. 1991. Peroxidases. *Practical Histochemistry*, 2nd edn. Chichester: John Wiley & Sons, pp. 224-225.

**Cheng** PC, Summers RG. 1988. Image contrast in confocal light microscopy. *IMR Press*, Madison, 163-179.

**Coons** AH, Creech HJ, Jones RN. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol*, 47:2000.

**Coons** AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol*, 45:159-70.

**Coons** AH, Kaplan MH. 1950. Localization of an antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J exp Med*, 91:1-13.

**Diamandis** EP. 1990. Analytical methodology for immunoassays and DNA hybridization assays – Current status and selected systems – Critical Review. *Clinica Chimica Acta* 194:19-50.

**Diamandis** EP, Christopoulos TK. 1991. The Biotin – (Strept)Avidin System. Principles and Applications in Biotechnology. [Review]. *Clin. Chem*, 37/5:625-636.

**Geneser** F. 1990. Histologie. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.

**Gomori** G. 1939. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. Proc Soc Exp Biol Med, 42:23-26.

**Gomori** G. 1952. Microscopic histochemistry: Principles and Practices. University of Chicago Press, Chicago.

**Gomori** G. 1953. Oxidative reactions of myeloid elements. J Histochem Cytochem, 1:486-92.

**Graham** GS. 1916. The oxidizing ferment of the myelocyte series of cells and its demonstration by an alphanaphtol-pyronin method. J med Res, 35:231-242.

**Graham** RC Jr, Lundholm U, Karnovsky MJ. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. J Histochem Cytochem, 13:150-152.

**Graham** RC, Karnovsky MJ. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubulus of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem Cytochem, 14:291-302.

**Gross** AJ, Sizer IW. 1959. The oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. J Am Chem Soc, 81:1611-1640.

**Gu** M, Sheppard CJR. 1993. Experimental investigation of fibre-optical confocal scanning microscopy: Including a comparison with pinhole detection. Micron, 24:557-565.

**Halbhuber** KJ, Feuerstein H, Hulstaert CE, Zimmermann N. 1994. Cerium as capturing agent in phosphatase and oxidase histochemistry. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

**Halbhuber** KJ, Sheven C, Jirikowsky G, Feuerstein H, Ott U. 1996. Reflectance enzyme histochemistry (REH): Visualization of cerium based and DAB primary reaction products of phosphatases and oxydases in cryostat sections by confocal laser scanning microscopy. *Histochem Cell Biol*, 105: 239-249.

**Halbhuber** KJ, Krieg R, Fischer P, König K, Nasse H. 2002. Jenfluor<sup>®</sup>ap – a novel fluorogenic substrate for *in situ* detection of alkaline phosphatase activity. *Cell Mol Biol*, 48 online paper OL343-OL358.

**Hancock** MB. 1986. Two-color immunoperoxidase staining: visualization of anatomic relationships between immunoreactive neural elements. *Amer J Anatomy*, 175:343-352.

**Hanker** JS, Anderson WA, Bloom FE. 1972. Osmiophilic polymer generation: Catalysis by transition metal compounds in ultrastructural cytochemistry. *Science*, 175:991-993.

**Hanker** JS. 1979. Osmiophilic reagents in electronmicroscopic histocytochemistry. [Review]  
*Prog Histochem Cytochem*, 12:1-85.

**Hansen** PA. 1964. Fluorescent Compounds used in Protein Tracing, Absorption and Emission Data. University of Maryland Report.

**Harten** U. 2002. Physik für Mediziner; 10. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

**Herold** G. 2006. Innere Medizin.

**Hiramoto** R, Engel K, Pressman D. 1958. Tetramethylrhodamine as immunohistochemical fluorescent label in the study of chronic thyroiditis. *Proc Soc exp Biol*, N.Y., 97(3):611-4.



**Hsu SM, Soban E.** 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 30:1079-1082.

**Jones GR.** 1969. The synthesis of yellow tetrazolium. *Histochemie*, 18(2):164-7.

**Karnovsky MJ.** 1994. Cytochemistry and reactive oxygen species: A retrospective. *Histochemistry*, 102:15-27.

**Kim SH, Shin YK, Lee JS, Lee KM.** 2003. An improved protocol of biotinylated tyramine – based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. *J Histochem Cytochem*, 51:129-132.

**Köhler G, Milstein C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.

**Krieg R, Oehring H, Halbhuber KJ.** 2000. Novel chromogenic substrates with metal chelating properties for the detection of peroxidatic activity, derived from 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) and 3,6-diamino-9-ethylcarbazole. *Cel Mol Biol*, 46:1191-1212.

**Krieg R, Oehring H, Halbhuber KJ.** 2001. Towards versatile metal associating substrates for determination of peroxidatic activity/hydrogenperoxide by chemical designing of *Schiff*base derivatives. *Cel Mol Biol*, 47 online paper OL209-OL234.

**Krieg R, Halbhuber KJ.** 2003. Recent advances in catalytic peroxidase histochemistry. *Cel Mol Biol*, 49/4:547-563.

**Krieg R, Halbhuber KJ.** 2004. Novel oxidative self-anchoring fluorescent substrates for the histochemical localization of endogenous and immunobound peroxidase activity. *Journal of Molecular Histology*, 35:471-487.

**Krieg R.** 2006. Entwicklung, Struktur-/Eigenschaftsoptimierung und Anwendung neuartiger multifunktionaler Chromogene und Fluorochrome für den histochemischen Nachweis von peroxidatischer Aktivität und *in vivo* Markierung zellulärer Organellen. Eine transmissionsmikroskopische, fluoreszenzoptische und ein-/multiphotonenlasermikroskopische Untersuchung [Habilitationsschrift]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

**Krieg R, Eitner A, Günther W, Halbhuber KJ.** 2007. Optimization of heterocyclic 4-hydroxystyryl derivatives for histological localization of endogenous and immunobound peroxidase activity. *Biotechnic and Histochemistry*, 82(4):235-262.

**Krieg R, Eitner A, Günther W, Schürer C, Lindenau J, Halbhuber KJ.** 2008. N,N-Dialkylaminostyryl dyes: specific and highly fluorescent substrates of peroxidase and their application in histochemistry. *J Mol Hist*, DOI 10.1007/s 10735-007-9150-1.

**Laurence DJR.** 1952. A study of the absorption of dyes on bovine serum albumin by the method of polarization of fluorescence. *Biochem J*, 51:168-80.

**Linß W, Halbhuber K-J.** 1991. Histologie und mikroskopische Anatomie. 17., neu bearbeitete Auflage. Leipzig: Thieme Verlag.

**Lippert H.** 2003. Lehrbuch Anatomie; 6. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer.

**Löffler G.** 2000. Basiswissen Biochemie; 4. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

**Mathies RA, Stryer L.** 1986. Single molecule fluorescence detection: a feasibility study using phycoerythrin. In: *Application of fluorescence in the biomedical sciences*. New York: Alan Liss Inc, 129-140.

**Mayahara H, Ogawa K.** 1968. The effect of thickness of specimen on the ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the rat proximal tubule. *J Histochem Cytochem*, 16:721-729.

**Mayahara** H, Ogawa K. 1980. Ultracytochemical localization of ouabain-sensitive potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase-activity in the rat kidney. *Acta histochem cytochem (Kyoto)*, 13:90-99.

**Mayer** A, Neuenhöfer S. 1994. Lumineszent labels – more than just an alternative to radioisotopes? *Angew Chem Int Ed Engl*, 33:1044-1072.

**Moses** HL, Rosenthal AS, Beaver DL, Schultman SS. 1966. Lead ion and phosphatase histochemistry. II. Effect of adenosine triphosphate hydrolysis by lead ion on the histochemical localization of adenosine triphosphatase activity. *J Histochem Cytochem*, 14:702-710.

**Naish** SJ. 1989. Handbuch II immunchemischer Färbemethoden. *Immunocytochemistry Laboratory*, DAKO Corporation.

**Pearse** AG. 1957. Intracellular localization of dehydrogenase systems using monotetrazolium salts and metal chelation of their formazans. *J Histochem Cytochem*, 5(5):515-27.

**Pearse** AGE. 1968. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 3<sup>rd</sup> Edition, Volume 1. Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York.

**Pearse** AGE. 1972. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 3<sup>rd</sup> Edition, Volume 2. Churchill Livingstone, Edinburgh and London.

**Pluta** M. 1989. Reflection contrast microscopy. In: *Advanced light microscopy: Specialized methods*, Vol. 2. Pluta M, eds., Elsevier, Amsterdam, 199-210.

**Redetzki** HM. 1958. Labelling of antibodies by 5-dimethylamino-1-naphthalene sulfonyl chloride, its effects on antigen-antibody reactions. *Proc Soc exp Biol, N.Y.*, 98:120-2.

**Reiner** L. 1930. On the chemical alteration of purified antibody-proteins. *Science*, 72:483-484.

**Rigaut** JP, Linares G, Vassy J, Downs AM, De Oliveira TC, De Cremoux P, Calvo F. 1993. Reflectance in situ hybridization- 3-D confocal laser imaging and quantitation after immunogold labelling of a riboprobe. *Cytometry Suppl*, 6:22.

**Riggs** JL, Loh PC, Eveland WC. 1960. A simple fractionation method for preparation of fluorescein-labeled gamma globulin. *Proc Soc exp Biol, N.Y.*, 105:655-8.

**Ritter** HB, Oleson JJ. 1947. A peroxidase reaction in paraffin sections. *Archs Path*, 43:330-332.

**Roche**. 1998. *Lexikon Medizin*; 4. Auflage. München: Urban & Fischer.

**Roderfeld** M, Matern S, Roeb E. 2003. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie: Der Blick in die Zelle. *Dtsch med Wochenschr*, 128:2539-2542.

**Rosa** CG, Tsou KC. 1963. The use of tetranitro-blue tetrazolium for the cytochemical localization of succinic dehydrogenase. *Cytochemical and cytological studies of sarcoma 37 ascites tumor cells. J Cell Biol*, 16:445-54.

**Rutenburg** AM, Gofstein R, Seligman AM. 1950. Preparation of a new tetrazolium salt which yields a blue pigment on reduction and its use in the demonstration of enzymes in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*, 10(2):113-21.

**Seidler** E, Kunde D. 1969. Improved histochemical demonstration of dehydrogenases with tetrazolium salts. *Acta Histochem*, 32(1):142-56.

**Silverstein** AM. 1957. Contrasting fluorescent labels for 2 antibodies. *J Histochem Cytochem*, 5:94-95.

**Speel** EJM, Ramaekers FCS, Hopman AHN. 1997. Sensitive multicolor fluorescence in situ hybridisation using Catalyzed Reporter Deposition (CARD) amplification. *J Histochem Cytochem*, 45:1439-1446.

**Takamatsu H.** 1939. Histologische Studien über die Phosphatase (I. Mitteilung). Histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. Trans. Soc. Path. Japan 29, 429-498.

**Tsou KC, Cheng CS, Nachlas MM, Seligman AM.** 1956. Synthesis of some  $\beta$ -nitrophenyl substituted tetrazolium salts as electron acceptors for the demonstration of dehydrogenase. J Am Chem Soc, 78:6139.

**Uehleke H.** 1958. New possibilities on the production of fluorescent-labelled protein. Z Naturforsch, 13b(11):722-4.

**van der Ploeg M, van Duijn P.** 1964a. The influence of peroxidases on the Dopa-system. J R microsc Soc, 83:405-14.

**van der Ploeg M, van Duijn P.** 1964b. 5,6-dihydroxy indole as a substrate in a histochemical peroxidase reaction. J R microsc Soc, 83:415-23.

**van Duijn P.** 1991. Model Systems. Principles and practice of the use of matrix-immobilized enzymes for the study of the fundamental aspects of cytochemical enzyme methods. In Histochemistry. Theoretical and Applied, Vol. 3, 4<sup>th</sup> edn (ed. PJ Stoward and AGE Pearse), pp. 433-472. Churchill Livingstone, Edinburgh.

**van Gijlswijk RP, Zijlmans HJ, Wiegant J, Bobrow MN, Erickson TJ, Adler KE, Tanke HJ, Raap AK.** 1997. Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization. J Histochem Cytochem, 45:375-382.

**van Norden CJF, Frederiks WM.** 1992. Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual of Current Methods. Royal Microscopical Society. Microscopy Handbooks 26. Oxford University Press.

**Veenhuis** M, Flik G, Wendelaar Bonga SE. 1980a.  $\text{CeCl}_3$ : a new capturing agent for the cytochemical demonstration of phosphatase activity. In: Electron microscopy, Vol.2. Brederoo P, De Priester W, eds., Proc Seventh Europ Congr Electron Microsc, 284-285.

**Veenhuis** M, Flik G, Wendelaar Bonga SE. 1980b. A new method for the cytochemical demonstration of phosphatase activity in yeast based on the use of cerous ions. FEMS Microbiol Lett, 9:285-29.

**Wasielewski** R, Mengel M, Gignac S, Wilkens L, Werner M, Georgi A. 1997. Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. J Histochem Cytochem, 45:1455-1459.

**Weber** G. 1952. Polarization of the fluorescence of macromolecules. II. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. Biochem J, 51:155-67.

**Weise** A, Liehr T, Claussen U, Halbhuber KJ. 2005. Increased Efficiency of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Using the Microwave. J Histochem Cytochem, 53(10):1301-1303.

**White** JG, Amos WB, Fordham M. 1987. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. J Histochem Cytochem, 37:941-946.

**White** NS, Lackie PM, Shotton DM. 1989. Imaging of immunogold labeled antigens on capping thymocytes by confocal reflection contrast scanning optical microscopy. Cell Biol Int Rep, 13:941-947.

**Wikipedia.** [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

**Wohlrab**, Seidler, Kunze. 1979. Histo- und Zytochemie dehydrierender Enzyme. Grundlagen und Problematik. Johann Ambrosius Barth Leipzig.

## 11. Anhang

### 11.1. Danksagung

Allen Mitarbeitern des Institutes für Anatomie/Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität danke ich für ihre Unterstützung, Hilfe und der Möglichkeit in diesem Team mitwirken zu können.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Karl-Jürgen Halbhuber für die Möglichkeit diese Thematik zu bearbeiten, seine Förderung und Forderung und mit seinen Anregungen mich für die Immunhistochemie zu begeistern.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Reimar Krieg, der unermüdlich und mit großer Begeisterung bei Fragen und Korrekturen immer zur Seite stand.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Frau Rentsch für die gute Koordination und stets freundliche Unterstützung bedanken.

Frau Bernhardt und Frau Hitschke danke ich für ihre Geduld und fachliche Kompetenz bei der Laborarbeit.

Herzlichen Dank gilt auch Frau Dr. A. Eitner und der Carl-Zeiss-Jena GmbH für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten am CLSM 510 META und den zahlreichen Tipps bei der Auswertung der Daten.

Ausdrücklich danke ich auch Herrn Dr. Berndt und Frau Geier (Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität) für die Realisierung der Zusammenarbeit auf dem Gebiet der pathologischen Gewebsdiagnostik.

Meinen Eltern Dr. Gabriele und Dr. Eugen Schürer und Bruder Matthias danke ich für die ruhigen, erholsamen Stunden zu Hause und für die stetige Unterstützung.

Danke Linn für die nervenaufreibenden Korrekturen, für die aufbauenden Worte, Motivation und Verständnis, sowie für die leckeren Schweinsöhrchen, falls es mal wieder länger dauerte im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei Waltraut Klimsch, die mir in schweren Zeiten immer selbstlos zur Seite stand – du hast eine wunderbare Gabe.

Meinen Freunden Benjamin Fischer, David Hummel und Daniel Kertscher danke ich für die entspannenden Stunden mit Musik und Intrinsic Vitality. You guys are awesome!

Wer auf den Herrn vertraut, den umgibt er mit Gnade. Psalm 32,10.

## 11.2. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name, Vorname:	Schürer, Christian
Geburtsdatum:	01.04.1983
Geburtsort:	Greiz
Familienstand:	ledig

### Schulbildung

09/1989	Einschulung
1989 – 1993	Grundschule Greiz-Pohlitz
1994 – 1999	Pestalozzigymnasium Greiz
1999 – 2000	High School Diploma an der McBain High Mc Bain, Michigan, USA
2000 – 2002	Pestalozzigymnasium Greiz
06/2002	Abitur

### Berufsausbildung

2002 – 2003	Zivildienst am Klinikum Obergöltzsch In Rodewisch
seit 2003	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 – 2006	Tutor für den Mikroskopischen Kurs am Institut für Anatomie/Anatomie II
seit 10/2005	Promotion am Institut für Anatomie/Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, den 30.10.2008

Unterschrift



### 11.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

1. Prof. Dr. Karl-Jürgen Halbhuber für die Konzeption und Durchsicht dieser Arbeit.
2. Herrn Dr. Reimar Krieg für die Unterstützung bei chemischen Fragen, Strukturbeziehungen und Korrekturen.
3. Fr. Bernhardt und Frau Hitschke für die histochemischen und immunhistochemischen Grundlagen.
4. Frau Eitner für die Unterstützung bei der Durchführung der spektralen Untersuchungen am CLSM.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 30.10.2008

Unterschrift